

Untersuchungen über die Maltose- und
Glucosevergärung
bei homozygoten Hefestämmen
mit verschiedenen Genomzahlen

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ragnhild Scheda
aus Berlin

1963



Gutachter:

Prof. Dr. S. Windisch

Prof. Dr. H. Lüers

Tag der mündlichen Prüfung: 23. 11. 1962

Tag der Promotion: 27. Feb. 1963

Inhaltsverzeichnis

1. Methodik	67
a) Verwendete Hefestämme	67
b) Nährböden	68
c) Einige mikrobiologische Arbeitsmethoden	68
2. Kreuzungen und Isolationsversuche	69
a) Aufbau homologer polyploider Reihen	69
b) Identifizierung der Maltose-Gene in den Stämmen $\alpha-41$ und MRA_2	75
c) Versuche zur Isolation maltosevergärender Mutanten aus Maltose-negativen Stämmen	76
3. Vergleichende Untersuchungen an Stämmen homologer polyploider Reihen	78
a) Trockengewicht, Zellzahl und Zellgröße	78
b) Vergärung von Glucose und Maltose	84
4. Diskussion	92
Zusammenfassung	97
Literatur	98

Aus der mikrobiologischen Abteilung des Instituts für Gärungsgewerbe Berlin

Untersuchungen über die Maltose- und Glucosevergärung bei homozygoten Hefestämmen mit verschiedenen Genomzahlen *

Von

RAGNHILD SCHEDA

Mit 15 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. Dezember 1962)

WINGE (1935) sowie WINGE u. LAUSTSEN (1937) gelang es nachzuweisen, daß der Entwicklungszyklus der Hefen aus einem normalen Wechsel von Haplo- und Diplophase besteht. Seitdem sind zahlreiche genetische Untersuchungen an Hefen vorgenommen worden. Bei diesen Arbeiten wurde auch das Vorkommen polyploider Formen beobachtet (ROMAN, HAWTHORNE u. DOUGLAS 1951; LINDEGREN u. LINDEGREN 1951 sowie POMPER 1952). Ein besonderer Vorteil der Hefen der Gattung *Saccharomyces* ist es, daß sich hier Stammserien aufbauen lassen, die das Genom eines haploiden Ausgangsstammes in den diploiden und polyploiden Stämmen identisch vervielfacht enthalten. Untersuchungen an solchen isogenen Stammreihen ermöglichen es, die Auswirkungen einer Erhöhung der Genomzahl auf verschiedene Eigenschaften des Organismus zu betrachten, ohne daß Veränderungen zwischen den einzelnen Kernwertigkeitsstufen infolge qualitativ unterschiedlicher Allele zu berücksichtigen sind. Eine Ausnahme bilden nur die Paarungstypallele a und α , die nicht in allen Stämmen einer solchen Reihe homozygot vorliegen können. Die für den Paarungstyp heterozygoten, di-, tri- und tetraploiden Stämme besitzen die Fähigkeit, Sporen zu bilden, während die Haplonten und homozygoten Diplonten kopulieren können.

Bei Kulturen einer homologen Stammserie treten in Abhängigkeit von der Genomzahl und der Kombination der Paarungstypallele sehr interessante Unterschiede in der Strahlenresistenz und bei einigen biochemischen Eigenschaften auf (LASKOWSKI 1960; LASKOWSKI u. STEIN 1960; STEIN u. LASKOWSKI 1960; LASKOWSKI, LOCHMANN, WACKER u. STEIN 1960). Die Autoren konnten zeigen, daß die Resistenz gegenüber ionisierenden Strahlen vom Haplonten über den Diplonten bis zum Triplonten zunimmt, während die Resistenz des Tetraplonten geringer ist als beim Triplonten und meist der des Diplonten entspricht. Von den Diplonten

* Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Freien Universität Berlin 1962.

sind die für den Paarungstyp homozygoten bedeutend sensibler als die heterozygoten. Diese höhere Strahlenresistenz der $\alpha\alpha$ -Stämme wird von LASKOWSKI (1960) als „ $\alpha\alpha$ -Effekt“ bezeichnet. Die Untersuchungen biochemischer Eigenschaften ergaben, daß der Gehalt bestimmter Substanzen je Zelle ansteigt in Abhängigkeit von der Kernwertigkeit und der Kombination der Paarungstypallele, wobei ein gleicher Gehalt je Trockengewicht bei den verschiedenen Stämmen einem der Genomzahl proportionalen Anstieg je Zelle entspricht, da Volumen und Trockengewicht der Stämme proportional der Kernwertigkeit zunehmen. Der RNS-, Nicotinsäure-, Pantothersäure- und Thiamingehalt je Trockengewicht stimmt bei den Stämmen überein. Dagegen unterscheiden sich die beiden Gruppen der sporulationsfähigen und der kopulationsfähigen Hefen im DNS-Gehalt und in der Folsäure- und Katalaseaktivität in dem Sinne, daß die für den Paarungstyp heterozygoten Stämme 40–50% höher im Gehalt bzw. in der Aktivität je Trockengewicht liegen. Auf welchem Mechanismus diese quantitative Veränderung mancher Zellbestandteile beruht und warum nur einige Substanzen betroffen werden, ist nicht bekannt.

Es war daher von Interesse, diese Untersuchungen auch auf andere physiologische Eigenschaften auszudehnen, speziell auf solche, bei denen die Gene, die die Produktion des Enzyms lenken, bereits näher untersucht sind. Bei Hefen sind nun besonders die Gene, welche die Vergärung eines Zuckers verursachen, eingehend bearbeitet worden. Daher sollten hier die Auswirkungen steigender Genomzahlen und der Kombination der Paarungstypallele auf die Gärintensität einer Hefe betrachtet werden, und zwar bei der Vergärung von Maltose. Bisher sind sechs verschiedene unabhängige Gene beschrieben worden, von denen jedes allein die Synthese eines Ferments steuert, das die Maltosevergärung ermöglicht. Um zu zeigen, inwieweit trotz genetischer Verschiedenheit der Ausgangsstämme homologer Reihen bei diesen gleichartige Veränderungen infolge steigender Genomzahl auftreten, sollten verschiedene Stammserien miteinander verglichen werden. Hierfür sollten neben der Reihe, die strahlenbiologisch untersucht worden ist, noch weitere aufgebaut werden und von allen Ausgangsstämmen dann bestimmt werden, wieviel und welche Maltose-Gene in ihnen enthalten sind. Es sollte ferner versucht werden, Polyplonten bereitzustellen, deren Genome bis auf die zu variierende Anzahl dominanter Maltoseallele vollständig übereinstimmen, um an diesen Hefen zu prüfen, ob sich eine Gendosiswirkung der Maltose-Gene nachweisen läßt. Der Aufbau solcher Stämme muß von Haplonten ausgehen, die sich nur in einem Maltoseallel unterscheiden. Hierfür war es nötig, prototrophe Mutanten aus Maltose-negativen Stämmen zu isolieren.

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen der Gärgeschwindigkeit sollten auch Bestimmungen des Trockengewichts je Zelle sowie des

Volumen und der Oberfläche der Zellen vorgenommen werden. Es war die Frage, ob die Gärintensität in gleichem Maße ansteigt wie die Trockensubstanz und das Volumen oder ob sich die relativ kleinere Oberfläche der polyploiden Zelle hemmend auf die Stoffwechselvorgänge auswirkt. Zur Bestimmung der Gärgeschwindigkeit wurde die CO_2 -Abgabe der Hefen unter anaeroben Bedingungen gemessen. Hierbei war es nötig, eine Versuchsanordnung zu finden, bei der die Gärgeschwindigkeit nicht durch eine Enzymreaktion begrenzt ist, die in der Reaktionsfolge hinter der Maltosespaltung liegt, wie zum Beispiel die weitere Vergärung der durch Spaltung entstehenden Glucose. Diese Voraussetzung dürfte dann gegeben sein, wenn die CO_2 -Abgabe beim Vorliegen von Maltose geringer ist als beim Substrat Glucose. Es wurde daher die Glucosevergärung parallel zur Maltosevergärung gemessen; so konnte auch die Auswirkung des Kernwertigkeitsgrades auf eine weitere Eigenschaft geprüft und mit den anderen verglichen werden.

1. Methodik

a) Verwendete Hefestämme

Für die Versuche standen die folgenden Hefestämme zur Verfügung. Die Stämme Nr. 1—8 können Maltose vergären.

1. Stamm α -41: Haploide Kulturhefe, enthält das Maltose-Gen M_1 , Vergärung von Saccharose, keine Vergärung von Galaktose, Melibiose und Raffinose. Paarungstyp α . Nicht bedürftig für Adenin, Uracil, Histidin, Methionin und Tryptophan. Von diesem Stamm leiten sich die folgenden Stämme der polyploiden Reihe I ab: der Haplont a , die Diplonten $\alpha\alpha$, aa und az sowie der Triplont $\alpha\alpha a$ und der Tetraplont $a\alpha\alpha\alpha$.

2. Stamm CII-5H: Haplont aus einem *Saccharomyces carlsbergensis*, vergärt Galaktose, keine Vergärung von Melibiose, Saccharose und Raffinose. Paarungstyp a .

3. Stamm CII-1H: Haplont aus einem *Saccharomyces carlsbergensis*, Vergärung von Galaktose, Saccharose und Raffinose, keine Vergärung von Melibiose. Paarungstyp a .

4. Stamm MRA_2 : Haploide Einzellisolation aus genetisch bearbeiteten Kulturhefen, enthält das Maltose-Gen M_1 , Vergärung von Saccharose und Raffinose, keine Vergärung von Galaktose und Melibiose. Paarungstyp α .

5. Stamm MRA_3 : Haploide Einzellisolation aus genetisch bearbeiteten Kulturhefen, Vergärung von Saccharose und Raffinose, keine Vergärung von Galaktose und Melibiose. Paarungstyp a .

6. Stamm MRA : Einzellisolation aus genetisch bearbeiteten Kulturhefen, Vergärung von Galaktose; keine Vergärung von Saccharose, Melibiose und Raffinose. Paarungstyp α .

7. Stamm dia-6H: eine haploide Kultur, isoliert aus *Saccharomyces diastaticus*, Vergärung von Saccharose, Maltotriose, Raffinose und Stärke, keine Vergärung von Melibiose. Paarungstyp α . Diese Kultur diente als Ausgangsstamm für die folgenden Stämme der Reihe II: den Haplont a , die Diplonten $\alpha\alpha$ und az sowie den Triplont $\alpha\alpha a$.

8. Stamm III/15/10a: Isolation aus einem genetisch bearbeiteten Triplonten, enthält M_6 , Vergärung von Galaktose, Saccharose und Raffinose, keine Melibiose. Paarungstyp a .

Die folgenden Stämme vergären keine Maltose.

9. Stamm 11-4a: Keine Vergärung von Galaktose, Maltose, Saccharose, Melibiose und Raffinose. Paarungstyp a.

10. Stamm 11-6a: Vergärung von Galaktose, keine Vergärung von Melibiose, Saccharose, Maltose und Raffinose.

b) Nährböden

Alle Hefen wurden in einer Hefeextrakt-Pepton-Lösung (YEP) nach ROMAN (1956) gezüchtet: 1% Hefeextrakt, 2% Pepton (Difco-Präparate) und 2% Glucose. Bei einigen Versuchen wurde als Kohlenhydratquelle Maltose statt Glucose zugegeben. Für feste Nährböden wurden zur YEP-Lösung noch 2% Agar zugefügt. Die Sporulationsansätze wurden auf Natrium-Acetat-Agar gemacht, der nach FOWELL (1952) zusammengestellt war: 0,4% wasserfreies Natriumacetat und 1,5% Agar. Atmungsdefekte Hefen wurden auf Lactat-Agar nach OGUR u. JOHN (1956) nachgewiesen: 0,35% Pepton, 0,3% Hefeextrakt (Difco-Präparate), 0,2% KH_2PO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 + 7 \text{ aqua}$, 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1% Natrium-Lactat, 2% Agar. Bei der Prüfung auf Vergärung bestimmter Zucker wurden zwei verschiedene Nährböden verwendet: 1. Eosin-Methylenblau-Agar (EMB-Agar) nach SPIEGELMAN (1950). Der Agar enthält 0,35% Pepton, 0,3% Hefeextrakt (Difco-Präparate), 0,2% KH_2PO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 + 7 \text{ aqua}$, 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2% Agar. Zu 100 ml sterilisiertem, noch flüssigem Agar wurden 2% des zu prüfenden Zuckers und 2 cm³ einer 2%igen Eosinlösung sowie 0,5 cm³ einer 0,5%igen Methylenblaulösung zugesetzt. Zucker und Farblösungen wurden steril filtriert. Die Vergärung wurde 2. in Durham-Röhrchen geprüft, die Testlösung enthielt 1% Pepton und 2% des jeweiligen Zuckers.

c) Einige mikrobiologische Arbeitsmethoden

Hier sollen nur einige mehrfach angewendete mikrobiologische Arbeitsmethoden beschrieben werden. Spezielle Versuchsanordnungen werden in den jeweiligen Kapiteln angegeben.

Für die Bestimmung der Paarungstypen wurden von einer festen Kultur des zu untersuchenden Stammes zwei Proben in leere Reagensgläser gegeben. Zu diesen Proben wurden 2 ml Nährlösung zugefügt, die mit einem Teststamm vom Paarungstyp α bzw. a beimpft war. Nach 15–20stündigem Bebrüten wurden die Ansätze mikroskopiert. Werden in einer Probe Zygoten beobachtet, so hat die Kultur den komplementären Paarungstyp des Teststammes. Für Kreuzungen wurden ebenfalls die beiden Ausgangsstämme in 2 ml Nährlösung geimpft, entsprechend der Massenkopulationstechnik von LINDEGREN u. LINDEGREN (1943). Waren nach 15–20stündigem Bebrüten Zygoten vorhanden, so wurde eine Öse der Kultur in 10 ml YEP-Lösung überführt. Nach 2 Tagen wurden von der Kultur Quadrantenausstriche angelegt. Von diesen lasen wir mikroskopisch nach weiteren 2 Tagen Kolonien mit großen Zellen aus. Diese wurden auf Schrägagarröhrchen übertragen.

Für die Sporenbildung züchteten wir die Hefen 3 Tage bei 29°C in 100 ml YEP-Lösung vor. Dann wurde die Flüssigkeit abgegossen, die abgesetzte Hefe auf drei Natrium-Acetat-Platten ausgespatelt und 3 Tage bebrütet. Die Ascosporen wurden mit Hilfe der Massenisolations-technik (EMEIS u. GUTZ 1958; GUTZ u. EMEIS 1959) gewonnen. Die Hefen wurden von den Acetatagarplatten mit Wasser, dem 0,3% Tween 80 zugesetzt war, abgeschwemmt. Diese Suspension sporulierender Hefen wurde unter Zusatz von 2 ml sterilem Paraffin und etwas Kieselgur in einem Homogenisator behandelt. Dabei werden die Zellwände der Hefen zerstört und die Sporen freigesetzt. Die Trennung der Sporen von den vegetativen Zellen und Zellresten erfolgt durch Zentrifugieren des Homogenisats. Da die Sporenoberfläche lipophile Eigenschaften besitzt, befinden sich die Sporen in dem Paraffin, das nach dem

Zentrifugieren abpipettiert wird. Um restlos alle vegetativen Zellen zu entfernen, wird das Sporen enthaltende Paraffin nochmals unter Zusatz von Wasser und Kieselsäure homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Eine Öse der Paraffin-Sporensuspension wurde auf YEP-Agar ausgeplattet und die Schalen so lange bebrütet, bis sich keine neuen Kolonien mehr entwickelten. Die Kolonien wurden abgeimpft und auf ihren Paarungstyp und andere Eigenschaften geprüft.

Der Test auf Vergärung bestimmter Zucker erfolgte auf Eosin-Methylenblau-Agar nach SPIEGELMAN (1950). Die zu untersuchenden Hefen wurden von Nähragarplatten mit dem Samtabdruckverfahren (replica plating-Technik von LEDERBERG u. LEDERBERG 1952) auf den EMB-Agar übertragen und 2 Tage bei 29°C bebrütet. Die gärenden Kolonien sind an einer dunklen, blauroten, metallisch grün glänzenden Farbe zu erkennen, während nichtgärende Kolonien farblos oder fast farblos bleiben. Einwandfreie Ergebnisse können mit dieser Methode nur dann erzielt werden, wenn die Hefen innerhalb von 2 Tagen gären. Es wurde daher in einigen Fällen die Prüfung in Gärröhrchen nach DURHAM vorgenommen. Die Gärröhrchen wurden 12 Tage bei 29°C bebrütet. Die statistische Sicherung der erhaltenen Ergebnisse erfolgte mit der χ^2 Methode von PEARSON (siehe WEBER). Als nicht mit der Hypothese vereinbar wurden Ergebnisse angesehen, für die sich eine Sicherheitswahrscheinlichkeit von $P \leq 5\%$ ergab.

2. Kreuzungen und Isolationsversuche

a) Aufbau homologer polyploider Reihen

Voraussetzung für den Aufbau einer homologen polyploiden Reihe ist das häufigere Auftreten von für den Paarungstyp heterozygoten und homozygoten Diplonten in einer haploiden Kultur. Nach ROMAN u. SANDS (1953) entstehen die homozygoten Diplonten durch Selbstdiploidisierung, das heißt durch Verdopplung der Chromosomenzahl ohne nachfolgende Sprossung des Haplonten. Heterozygote Diplonten treten als Folge einer spontanen Mutation am Paarungstyplocus und Kopulation dieses Haplonten mit einem vom komplementären Paarungstyp auf. Da in diesen Mischkulturen die diploiden Zellen eine etwas schnellere Folge der Sproßgenerationen haben als die haploiden, werden die Diplonten durch mehrere Passagen in flüssigem Nährboden in der Kultur angereichert. Dadurch wird die Isolation erleichtert.

Um aus haploiden Kulturen diploide Zellen zu gewinnen, wurden die Stämme in 10 ml YEP-Lösung kultiviert und alle 24 Std eine Öse der Suspension in ein neues Röhrchen geimpft. Nach 10–15 solcher Passagen versuchten wir, diploide Zellen mit dem Mikromanipulator oder auf Platten zu isolieren. Im ersten Falle wurden aus einer wäßrigen Suspension der Hefe große Zellen mit Hilfe eines Mikromanipulators in sterile YEP-Agartropfen übertragen. Nach 24 Std Bebrütung wurden die gebildeten Kolonien mikroskopiert. Waren die Zellen größer als die des Ausgangsstammes, prüften wir, ob diese vermutlich diploiden Kulturen kopulationsfähig waren. Bei der Isolation auf Platten wurde die Mischkultur von haploiden und diploiden Zellen auf YEP-Agar gebracht. Die Suspension war so eingestellt, daß etwa 60 Zellen je Platte ausgespatelt wurden. Nach dreitägigem Bebrüten bei 29°C konnten die Kolonien mit dem Samtabdruckverfahren auf Natrium-Acetat-Agar übertragen werden. Nach weiteren 3 Tagen wurden die Kolonien auf dem Natrium-Acetat-Agar mikroskopiert. Homozygote diploide Kulturen können nur nach der Zellgröße ausgelesen werden, heterozygote sind zusätzlich noch an der Sporenbildung

zu erkennen. Aus diesen sporulierenden Diplonten können mit der Massenisolations-technik Sporen mit dem der haploiden Ausgangskultur entgegengesetzten Paarungstyp gewonnen werden. Diploidisieren diese Einsporkulturen, so lassen sich auch für diesen Paarungstyp homozygote Diplonten isolieren.

Von den haploiden Stämmen mit dem Paarungstyp a bzw. α und den diploiden mit den Allelen $\alpha\alpha$ und aa ausgehend, können durch entsprechende Kreuzungen Tri- und Tetraplonten erhalten werden. Der Polyploidiegrad dieser Stämme wurde durch eine genetische Analyse nochmals kontrolliert. Die Sporen der Hybriden wurden mit der Massenisolations-technik gewonnen und ihre Paarungstypen bestimmt. Von einem heterozygoten Diplonten erhält man haploide Einsporkolonien vom Paarungstyp a und α im Verhältnis 1:1. Auch für Polyplonten lassen sich für das Aufspaltungs-verhältnis theoretische Voraussagen machen. Unter der Annahme, daß nur Bivalente gebildet werden, ist bei der Isolation der Sporen eines Tetraplonten der genetischen Konstitution $\alpha\alpha aa$ folgende Verteilung der Paarungstypen zu erwarten: $1aa:1\alpha\alpha:4\alpha a$. Da der Paarungstypolocus relativ eng mit dem Centromer gekoppelt ist (ROMAN, PHILLIPS u. SANDS 1955 sowie MORTIMER 1958) und infolgedessen die Häufigkeit von crossing-over gering ist, wird dieses Aufspaltungsverhältnis auch durch Multivalentbildung nicht wesentlich geändert. Bei triploiden Hefen können während der Chromosomenpaarung Uni-, Bi- und Trivalente gebildet werden, infolgedessen treten Kerne mit haploiden bis triploiden sowie solche mit aneuploiden Chromosomensätzen auf. Diese Meiosis-anomalien werden auch als Ursache für die bei Triplonten häufig geringe Sporenbildung und Sporenkeimung angesehen (EMEIS u. WINDISCH 1960; EMEIS 1961 und EMEIS 1962). Die Autoren fanden, daß bei Triplonten die Paarungstypallele ein Aufspaltungsverhältnis zeigen, das dem von trisomen Typen entspricht. Demnach führten die bei der Reduktionsteilung entstehenden Kerne mit vollständigen oder nur geringfügig abweichenden Chromosomensätzen zur Entwicklung lebensfähiger Sporen, während aneuploide Kerne eliminiert wurden. Für einen Triplonten mit den Paarungstypallelen $\alpha\alpha a$ ergibt sich unter diesen Voraussetzungen folgende Aufspaltung:

$$\alpha\alpha:\alpha:\alpha:a \text{ wie } 2:1:2:1$$

Da bei der Analyse nicht zwischen homozygoten Diplonten und Haplonten gleichen Paarungstyps unterschieden werden kann, ist es zweckmäßig, die $\alpha\alpha$ - und α -Typen in einer Gruppe α' zusammenzufassen. Statt der obengenannten Verteilung ergibt sich dann die folgende:

$$\alpha\alpha:\alpha':a = 2:3:1$$

Versuchsergebnisse

Es wurden zunächst die Hefen *MrA*, *MRA₂*, *MRA₃*, *CII-1H* und *CII-5H* als Ausgangsstämme für den Aufbau isogener Reihen herangezogen. In den haploiden Kulturen dieser fünf Stämme traten nach 12–15 Passagen in 10 ml YEP-Lösung häufiger große, vermutlich diploide, Zellen auf. Die Diplonten ließen sich nach den zwei bereits beschriebenen Methoden isolieren. 20–30% der mit dem Mikromanipulator isolierten Zellen bildeten Kolonien, die sich als haploid erwiesen. Großzellige Kolonien wurden auf ihre Kopulations- und Sporulationsfähigkeit geprüft. Für die verschiedenen Stämme ist die Gesamtzahl der isolierten Zellen und der jeweilige Anteil der für den Paarungstyp homozygoten bzw. heterozygoten Diplonten sowie der Haplonten in Tab. 1 zusammengefaßt. Die parallellaufenden Isolierungsversuche auf Platten zeigten,

daß die haploiden Kulturen 2–20% diploidisierte Zellen aufwiesen. In Tab. 2 sind für sechs Stämme die Gesamtzahl der mikroskopierten Kolonien und die Anteile der für den Paarungstyp homozygoten und der $\alpha\alpha$ Diplonten sowie der Haplonten angegeben.

Tabelle 1. Kernwertigkeit von mit dem Mikromanipulator isolierten Einzellkulturen

Stamm	Gesamtzahl	$\alpha\alpha$ - und aa-Diplonten	$\alpha\alpha$ -Diplonten	Haplonten
<i>CII-5H</i>	20	8	9	3
<i>MRA₂</i>	20	7	10	3
<i>MRA₃</i>	100	81	—	19
<i>MrA</i>	100	75	—	25
<i>CII-1H</i>	100	69	—	31

Tabelle 2. Kernwertigkeit der Einzellkulturen, die durch Ausplatten gewonnen wurden

Stamm	Gesamtzahl	aa- und $\alpha\alpha$ -Diplonten	$\alpha\alpha$ -Diplonten	Haplonten
<i>CII-5H</i>	65	6	5	54
<i>MRA₂</i>	70	8	4	58
<i>MRA₂^a</i>	150	3	—	147
<i>MRA₃</i>	500	64	—	436
<i>MrA</i>	500	50	—	450
<i>CII-1H</i>	520	23	—	497

Mit beiden Isolationsmethoden konnten von allen Stämmen für den Paarungstyp homozygote Diplonten gewonnen werden und für zwei Stämme $\alpha\alpha$ Diplonten. Aus den Stämmen *MrA*, *MRA₂* und *CII-1H* wurden nur homozygote diploide Zellen erhalten. Von einer aus dem Stamm *CII-5H* isolierten sporulierenden Kultur wurden mit Hilfe der Massenisolations-technik die Ascosporen gewonnen. Von 300 Kolonien enthielten bei Prüfung auf den Paarungstyp alle das Allel *a* der haploiden Ausgangskultur. Da es nicht gelang, Haplonten mit dem komplementären Paarungstyp zu finden, war auch dieser Stamm, ebenso wie die drei anderen, nicht zum Aufbau einer Reihe geeignet. Stamm *MRA₂* bildete kopulierende und sporulierende Diplonten. Die aus den letzteren isolierten Ascosporen ergaben eine Aufspaltung für den Paarungstyp *a*: α wie 1:1. Einige der haploiden Einsporkulturen mit dem Paarungstyp *a* wurden zur Isolation von aa-Diplonten herangezogen. Es traten trotz ständigen Überimpfens erst nach etwa 2 Monaten 2% homozygote Diplonten auf. Zwei Diplonten wurden miteinander gekreuzt *MRA₂/daa* $\times$ *MRA₂/d $\alpha\alpha$* .

Bei den Ascosporen des Bastards ergab sich folgende Verteilung der Paarungstypen: 28*a*:17 α :47 $\alpha\alpha$. Diese Aufspaltung stimmt nicht mit der für einen Tetraplonten zu erwartenden Verteilung von 15,3*a*:15,3 α :61,2 $\alpha\alpha$

überein. Ebensowenig läßt sie sich als Aufspaltung eines Triplonten $45,9a':15,3\alpha:30,6\alpha a$ denken. Die Möglichkeit, daß es sich bei einem der Kreuzungspartner um einen Haplonten handelte, ist somit auch ausgeschlossen. Erneutes Kreuzen zweier Diplonten ergab einen Tetraplonten, dessen Ascosporen bei der Paarungstypanalyse die folgende Aufspaltung zeigten:

gefunden	$13a:15\alpha:68\alpha a$
erwartet	$16a:16\alpha:64\alpha a$

Die Verteilung der einzelnen Typen ist dem Spaltungsverhältnis $1:1:4$ gut angenähert ($\chi^2 = 1,437$, $P = 48\%$).

Ein Triplont wurde aus der Kreuzung $MRA_2\alpha\alpha \times MRA_2a$ erhalten. Die isolierten Sporen zeigten folgende Verteilung der Paarungstypen:

gefunden	$33\alpha a:47\alpha':16a$
erwartet	$32\alpha a:48\alpha':16a$

Die Verteilung der einzelnen Typen entspricht sehr gut dem Spaltungsverhältnis $2:3:1$ ($\chi^2 = 0,052$, $P = 97\%$).

Bei Kontrollversuchen zeigte es sich jedoch, daß die nichtkopulierenden Kulturen auf Natrium-Acetat-Agar keine Sporen bildeten. Es wurden daher nochmals alle Kolonien auf den Paarungstyp geprüft. 14 Tage nach der Massenisolation war keine der Einsporkolonien des Triplonten mehr fähig, mit den haploiden Teststämmen Zygoten zu bilden, während aus dem Tetraplonten noch sechs vom Paarungstyp α mit einem a -Stamm kopulierten. Eine vollständige Wiederholung der Versuche zeigte, daß die Aufspaltungsergebnisse nicht reproduzierbar waren. Es wurden nochmals aus dem tri- und tetraploiden Stamm Sporen gewonnen. Die Analyse der Einsporkolonien ergab folgende Aufspaltungen: $\emptyset$ = nicht kopulierende Kolonien

Triplont	gefunden:	$17a:31\alpha':48\emptyset$
	erwartet:	$16a:48\alpha':32\emptyset$
Tetraplont	gefunden:	$28a:21\alpha:47\emptyset$
	erwartet:	$16a:16\alpha:64\emptyset$

Diese Ergebnisse stimmen nicht mit den Erwartungen für einen Triplonten bzw. Tetraplonten überein. Die Verteilung $28a:21\alpha:47\emptyset$ entspricht etwa der bereits einmal für eine Kreuzung $MRA_2aa \times MRA_2\alpha\alpha$ gefundenen von $28a:17\alpha:47\emptyset$. Bei einem $MRA_2\alpha a$ -Diplonten, der $a:\alpha$ wie $50:46$ spaltete, ergab sich 10 Tage später bei nochmaliger Prüfung derselben Kolonien eine Verteilung von $27a:22\alpha:47\emptyset$. Die Aussagen über den Polyploidiegrad der untersuchten Stämme auf Grund der Ergebnisse der Paarungstypanalyse schienen bei diesem schnellen Verlust der Kopulationsfähigkeit in Frage gestellt. Bei einem Vergleich der Zellgröße der homozygoten Diplonten mit den Haplonten und der Tri- und Tetraplonten mit dem αa -Diplonten konnten die Unterschiede nicht

mehr festgestellt werden, die bei der Isolation der Diplonten und nach den Kreuzungen vorhanden gewesen waren. Demnach traten bei Einzellisolationen aus den Haplonten MRA_2 haploide Kulturen unterschiedlicher Zellgröße auf, von denen die großzelligen im Laufe von einigen Wochen wieder die normale haploide Größe zeigten. Es wurde daher angenommen, daß es sich bei den isolierten für den Paarungstyp homozygoten Diplonten um Kulturen solcher großzelliger Haplonten gehandelt hatte, und daß die tri- bzw. tetraploide Aufspaltung durch einen Verlust der Kopulationsfähigkeit von einem Teil der haploiden Einsporkulturen vorgetäuscht wurde.

Da sich von den bearbeiteten fünf haploiden Stämmen keiner zum Aufbau einer Reihe eignete, wurden noch andere Stämme zu Versuchen herangezogen, und zwar nach folgenden Gesichtspunkten: Frisch aus der Natur isolierte polyploide Hefen bilden im allgemeinen recht gut Sporen; es lassen sich aus diesen Polyplonten heterozygote Diplonten isolieren und aus diesen wieder Haplonten. Es wurde vermutet, daß diese haploiden Kulturen leicht diploidisieren und somit die Polyplontenbildung begünstigen. Aus einem gut sporulierenden Tetraplonten, isoliert von Weintrauben, wurden mit Hilfe der Massenisolierungstechnik die Sporen gewonnen und ihre Paarungstypen bestimmt. Einige nichtkopulierende Diplonten wurden zur Sporulation angesetzt, die Ascusbildung war jedoch nicht so häufig wie bei dem Tetraplonten. Die isolierten Ascosporen wuchsen alle nicht an, so daß diese Hefe nicht mehr bearbeitet werden konnte.

Weitere Versuche wurden mit dem Stamm $III/15/10$ ausgeführt, einem Haplonten, der aus einem Triplonten isoliert war. Bei diesem Stamm war während anderer Versuche beobachtet worden, daß die Kultur nach kurzer Zeit diploidisierte und ihre Kopulationsfähigkeit verlor. Auf Natrium-Acetat-Agar bildete die Hefe dann Sporen, diese wurden isoliert und die Paarungstypen bestimmt. Es war die Spaltung eines Diplonten $a:\alpha = 1:1$ zu erwarten. Das Ergebnis läßt sich jedoch nur als Aufspaltung eines Tetraplonten deuten:

gefunden	17 a:15 α :64 αa
erwartet	16 a:16 α :64 αa

Die Verteilung der einzelnen Typen entspricht sehr gut der theoretischen von $1:1:4$ für einen Tetraplonten ($\chi^2 = 0,125$, $P = 89\%$).

Eine sporulierende Einsporkultur aus diesem Tetraplonten wurde mit der Massenisolierungstechnik weiter analysiert. Es ergab sich eine für einen Diplonten typische Aufspaltung von $a:\alpha = 1:1$.

Die Haplonten diploidisierten jedoch sofort wieder. Auf YEP-Agar bildeten alle Kulturen dieser Reihe — d.h. sowohl die ursprünglich haploiden und die für den Paarungstyp homozygoten Stämme als auch die αa Diplonten und die Tetraplonten — Sporen. Es war daher nicht möglich, stabile Stämme, an denen physiologische Untersuchungen durchgeführt werden konnten, bereitzustellen. Für das Auftreten tetraploider Zellen in einer ursprünglich haploiden Kultur wären zwei Möglichkeiten

denkbar, einmal durch Bildung von $\alpha\alpha$ -Diplonten und weitere Endopolyloidisierung derselben. Bei der hohen Mutabilität des Paarungstyplocus des vorliegenden Stammes erscheint die folgende Entstehungsweise jedoch wahrscheinlicher: Aus einem $\alpha\alpha$ -Diplonten könnte infolge einer Mutation ein $\alpha\alpha$ -Diplont resultieren, durch Kopulation mit einem durch Endopolyloidisierung entstandenen aa -Diplonten wäre dann die Bildung eines Tetraplonten möglich.

Bei Arbeiten mit *Saccharomyces diastaticus* hatte es sich gezeigt, daß haploide Kulturen nach zwei- bis dreiwöchigem Wachstum auf YEP-Agar ihre Kopulationsfähigkeit verloren und auf Natrium-Acetat-Agar Sporen bildeten. In anderen Kulturen traten homozygote Diplonten auf. Eine Kultur des Stammes *Dia-6H* wurde nach zwei Passagen in flüssigem Nährboden auf Natrium-Acetat-Agar zur Sporenbildung gebracht. Die Sporen wurden isoliert und die Paarungstypen bestimmt. Es ergab sich eine 1:1 Aufspaltung für $a:\alpha$. Es lag also ein $\alpha\alpha$ -Diplont vor. Zur Isolation von aa und $\alpha\alpha$ -Diplonten wurden haploide Kulturen mit dem Paarungstyp a bzw. α nach zehn Passagen in flüssigem Nährboden auf YEP-Agar ausgeplattet. Es gelang, homozygote Diplonten mit dem Paarungstyp $\alpha\alpha$ mikroskopisch auszulesen. Bei fünf verschiedenen haploiden Einsporkulturen mit dem Paarungstyp a wurden unter 2000 mikroskopierten Kolonien 168 sporulierende, jedoch keine für den Paarungstyp homozygoten Diplonten gefunden. Es konnte daher nur die Kreuzung eines Diplonten $\alpha\alpha$ mit einem Haplonten a durchgeführt werden. Die aus diesem Triplonten isolierten Sporen wurden auf ihren Paarungstyp geprüft.

gefunden	13a:47 α :36aa
erwartet	16a:48 α :32aa

Dies entspricht der für einen Triplonten erwarteten Aufspaltung 1:3:2 ($\chi^2 = 1,083$; $P = 60\%$).

Alle nichtkopulierenden Kolonien bildeten auf Acetat-Agar Sporen. Die genetische Analyse von drei solcher sporulierenden Kulturen ergab für die Paarungstypen eine 1:1 Aufspaltung und bestätigte die Annahme, daß es sich um heterozygote Diplonten handelt. Die Eigenschaften des Haplonten a , der Diplonten $\alpha\alpha$ und $\alpha\alpha$ sowie des Triplonten stimmten abgesehen von den Paarungstypallelen mit denen des Ausgangsstammes *Dia-6H* überein. Die Möglichkeit, daß bei den Isolationen Infektionen vorliegen, kann also ausgeschlossen werden.

Die mit acht Stämmen zum Aufbau isogener Reihen ausgeführten Versuche haben gezeigt, daß sich die haploiden Kulturen hinsichtlich der Diplontenbildung sehr unterschiedlich verhalten. In einigen Fällen wurden keine heterozygoten Diplonten gefunden, in anderen diploidisierten die Stämme innerhalb weniger Tage. Es ist nicht zu unterscheiden, ob das häufige Auftreten von $\alpha\alpha$ -Diplonten auf eine erhöhte Mutabilität des

Paarungstypococus zurückzuführen ist oder ob die Mutationsrate bei den verschiedenen Stämmen gleich ist und die Diplonten infolge eines besonders großen Selektionsvorteils gegenüber den Haplonten so rasch in den Kulturen angereichert werden. Daß stammspezifische unterschiedliche spontane Mutationsraten bei Mikroorganismen auftreten können, wurde für *Salmonella typhimurium* von MIYAKE (1960) beschrieben. Die höhere Mutationsrate eines der untersuchten Stämme beruht hier auf einem Mutabilitätsfaktor, der monofaktoriell vererbt wird und die Mutationsrate verschiedener Loci um das 6—500fache erhöhen kann.

b) Identifizierung der Maltose-Gene in den Stämmen α -41 und MRA_2

Bis jetzt sind sechs verschiedene unabhängige Maltose-Gene beschrieben worden, von denen jedes allein die Synthese eines Enzyms steuert, das die Maltosevergärung ermöglicht. WINGE u. ROBERTS (1948; 1950, 1950a, 1956) identifizierten bei *Saccharomyces cerevisiae* M_1 , M_2 , M_3 und M_4 und bei *Saccharomyces carlsbergensis* M_6 . Bei *Saccharomyces diastaticus* wurde von GILLILAND (1954) M_5 und M_1 gefunden. Ist das Gen M_2 , M_5 oder M_6 vorhanden, so kann nur Maltose vergoren werden, während die Gene M_1 und M_4 die Produktion von α -Glucosidase lenken, es kann dann auch Saccharose vergoren werden. Es erschien daher von Interesse, die Anzahl der Maltose-Gene in den Ausgangsstämmen der Reihen zu bestimmen und ihre Identität mit den bereits beschriebenen Genen nachzuweisen.

Stamm α -41 enthält nur ein Maltose-Gen, dies war bereits von LASKOWSKI (1960) festgestellt worden. Daß im Stamm MRA_2 auch nur ein Maltose-Gen vorliegt, wurde von mir durch Kreuzen mit dem Maltose-negativen Stamm 11-4a nachgewiesen. Die aus dem Diplonten isolierten Sporen zeigten ein Verhältnis von Vergärern zu Nichtvergärern von 1:1. Zunächst sollte nun geprüft werden, ob das jeweilige Maltose-Gen mit dem Gen M_1 identisch ist. Die beiden Haplonten α -41 und MRA_2 wurden mit dem haploiden Stamm Nr. 21, der das Gen M_1 enthält, gekreuzt. Bei Identität der beiden M-Gene müssen alle aus dem Diplonten isolierten Einsporkulturen Maltose vergären können. Liegen zwei verschiedene M-Gene vor, wäre eine 3:1 Spaltung für Maltosevergärer zu Nichtvergärern zu erwarten. Neben der Maltosevergärung wurden noch die Paarungstypen bestimmt. Außerdem wurde die Adeninabhängigkeit geprüft. Der das M_1 -Gen enthaltende Kreuzungspartner war ein adeninbedürftiger Haplont, der einen roten Farbstoff akkumulierte.

Die aus den Hybriden isolierten Einsporkolonien zeigten folgende Aufspaltungen:

1. Kreuzung: Stamm Nr. 21 $\times$ Stamm α -41

Paarungstypen	α : a = 51:49
Adeninbedürftig: unabhängig	ad:Ad = 44:56
Maltosevergärer: Nichtvergärer	M: m = 100: 0

2. Kreuzung: Stamm Nr. 21 $\times$ Stamm MRA_2

Paarungstypen	α : a = 45:55
---------------	----------------------

Adeninbedürftig: unabhängig	ad:Ad = 50:50
-----------------------------	---------------

Maltosevergärer: Nichtvergärer	M: m = 100: 0
--------------------------------	---------------

Die 1:1 Aufspaltungen für die Adeninbedürftigkeit und den Paarungstyp zeigen, daß die beiden Hybriden, wie zu erwarten, diploid waren. Unter den Einsporisolationen traten keine Nichtvergärer auf. Die beiden Stämme α -41 und MRA_2 enthalten folglich das Maltose-Gen M_1 . Der Stamm *dia-6H* besitzt nach Untersuchungen von WINDISCH u. EMEIS (1960) drei Maltose-Gene. Es handelt sich um M_1 und M_5 und ein M-Gen, dessen Identität mit einem der sechs bereits beschriebenen Gene nicht nachgewiesen werden konnte.

c) *Versuche zur Isolation maltosevergärender Mutanten aus Maltose-negativen Stämmen*

An den Stämmen isogener Reihen können nur die durch das doppelte, dreifache und vierfache Genom bedingten Veränderungen der Maltosevergärung untersucht werden. Um zu klären, inwieweit hier auch eine Gendosiswirkung der Maltose-Gene vorliegt, sollte versucht werden, Polyponten bereitzustellen, deren Genome bis auf die zu variierende Anzahl dominanter Maltoseallele vollständig übereinstimmen. Zum Aufbau solcher Stämme wurde von Hefen ausgegangen, die nicht zur Vergärung von Maltose fähig sind. Treten in einer solchen Kultur spontane Mutationen zum Vergärerstyp auf, so können diese Mutanten in maltosehaltigem Nährboden durch Selektion angereichert werden. Nach LINDEGREN (1956) kann z.B. eine Spätagadaptation an einen Zucker auf einer Mutation zum Vergärerstyp und anschließender Selektion desselben beruhen. Gelingt es, zwei haploide Stämme, die sich nur in einem Maltose-Allel unterscheiden, bereitzustellen, so könnte der Maltose vergärende Haplont als Ausgangsstamm einer polyploiden Reihe herangezogen werden. Durch Kreuzung eines M-Haplonten bzw. MM-Diplonten dieser isogenen Reihe mit dem m-Haplonten wäre es möglich, Mm-Diplonten und MMm-Triponten zu erhalten und mit denen der homologen Stammserie zu vergleichen.

Als Selektionsmedium diente YEP-Lösung, in der die Glucose durch Maltose ersetzt war. 110 ml des Nährbodens wurden mit einem Maltose-negativen Stamm so beimpft, daß sie je Milliliter 10^6 Zellen enthielten. Nach 24stündiger Schüttelkultur wurden 10 ml der Suspension in neue YEP-Lösung + Maltose gegeben. Von der achten Passage ab wurden bei jeder zweiten Weiterführung Proben genommen und mit diesen fünf YEP-Agar-Platten beimpft. Nach dreitägigem Bebrüten wurden die 50–100 gebildeten Kolonien je Platte auf EMB-Agar übertragen. Die Gärfähigkeit der Kolonien konnte nach 2 Tagen beurteilt werden. In einem Vorversuch wurde geprüft, ob bei ständigem Überimpfen einer Kultur eines Maltose-negativen Stammes in maltosehaltigem Nährboden Vergärerstypen einen solchen Selektionsvorteil haben, daß sie durch Ausplatten und Übertragen der Kolonien auf Spiegel-

man-Agar identifiziert werden können. Enthielt die Ausgangssuspension auf 10^8 Maltose-negative Zellen eine maltose-vergärende Zelle, so waren die Vergärertypen nach zehn Passagen so angereichert, daß 50% der ausgeplatteten Kolonien Maltose vergoren.

Zu den Hauptversuchen wurden die Stämme *11-4a* und *11-6a* herangezogen. Von jedem Stamm wurden in zehn unabhängigen Versuchsserien nach der 8.—14. Passage Proben ausgeplattet. So wurden von Stamm *11-6a* 10700 Kolonien geprüft und von Stamm *11-4a* 12356. Alle waren nicht fähig, Maltose zu vergären.

Da es mit dieser Versuchsanordnung nicht gelang, Mutanten zu isolieren, wurden die beiden Stämme atmungsdefekt gemacht. Hierfür wurden die Hefen 2 Tage in einer YEP-Lösung gezüchtet, die Trypaflavin in einer Konzentration von $1:10^6$ enthielt, und anschließend Proben auf YEP-Agar ausgeplattet. Die zu weiteren Versuchen verwendeten Einzell-Isolationen wurden zur Kontrolle auf Lactat-Agar gebracht, atmungsdefekte Hefen zeigen hierauf kein Wachstum. In Nährböden, die als Kohlenhydratquelle Maltose enthielten, wuchsen diese Hefen auch fast gar nicht. Spontan auftretende Vergärertypen sollten demnach einen großen Selektionsvorteil haben. Außerdem konnte zur Isolation maltose-vergärender Zellen aus atmungsdefekten Kulturen noch eine andere Methode angewendet werden, die es erlaubte, mehr Kolonien auf einer Platte zu prüfen. In einem Vorversuch wurde eine Suspension hergestellt, die auf 2000 atmungsdefekte Maltose-negative Zellen 1 atmungsdefekte M-positive enthielt. Diese Mischung wurde auf Spiegelmanagar ausgespatelt, etwa 1000 Zellen je Platte. Die M-negativen atmungsdefekten Hefen wuchsen auf diesem Agar kaum, während M-positive nach 2—4 Tagen große, dunkel gefärbte Kolonien gebildet hatten, die sich leicht isolieren lassen. Es wurden nun Versuche mit atmungsdefekten Stämmen der Hefen *11-6a* und *11-4a* durchgeführt. Von jeder Hefe wurden zehn Einzelansätze, die in 110 ml Ausgangskultur 10^7 Zellen je ml enthielten, gezüchtet und nach sechs Passagen geprüft. Die flüssige Kultur wurde vor dem Ausplatten auf EMB-Agar so verdünnt, daß etwa 1000 Zellen je Platte ausgespatelt wurden. Von jedem Ansatz wurden zehn Platten angelegt. Es gelang auch mit Hilfe dieser Versuchsanordnung nicht, Mutanten zu isolieren. Es muß daher angenommen werden, daß spontane Mutationen zum Vergärertyp bei diesen Stämmen sehr selten sind oder überhaupt nicht vorkommen.

Es sollte daher versucht werden, durch UV-Bestrahlung Mutationen an den Maltose-Loci zu induzieren. Zu diesen Versuchen benutzten wir eine Hg-Niederdrucklampe (Osram HNS 12); der Bestrahlungsabstand betrug 12 cm, die Zeit 30 sec. 8 ml einer Suspension, die etwa 10^7 Zellen je ml enthielt, wurden unter Schütteln in einer Petrischale bestrahlt. Unter diesen Bedingungen betrug die Überlebensrate 1%. Nach der

Behandlung mit UV wurde die Suspension in 50 ml YEP-Lösung mit Glucose gegeben und 5 Std unter Lichtabschluß bebrütet. Je 25 ml dieser Kultur dienten zum Beimpfen eines Erlenmeyerkolbens mit 110 maltosehaltiger YEP-Lösung. Nach 6 und 12 Passagen wurden Proben ausgeplattiert. Zur Untersuchung wurde je ein normaler und ein atmungsdefekter Stamm der Hefen 11-4a und 11-6a herangezogen. Bei je 25 Bestrahlungsversuchen je Stamm gelang es nicht, Mutanten zu finden.

3. Vergleichende Untersuchungen an Stämmen homologer polyploider Reihen

Die Geschwindigkeit der Glucose- und Maltosevergärung verschiedener Hefestämme isogener Reihen sollte verglichen werden. Zur Bestimmung der Gärintensität wurde die CO₂-Abgabe der Hefen unter anaeroben Bedingungen im Warburgapparat gemessen. Um die CO₂-Entwicklung sowohl je Milligramm Trockengewicht als auch je Zelle zu ermitteln, wurde für jeden Ansatz das Trockengewicht und die Zellzahl der Impfsuspension für die Warburgmessung bestimmt. Außerdem sollte das Trockengewicht je Zelle berechnet werden, um festzustellen, ob eine dem Polyploidiegrad proportionale Zunahme des Trockengewichts vorliegt. Weiterhin wurden das Volumen und die Oberfläche der Zellen bestimmt. Der Quotient Oberfläche zu Volumen verringert sich mit steigendem Polyploidiegrad. Es sollte geprüft werden, ob diese morphologischen Veränderungen die Gärintensität beeinflussen. Für sämtliche Untersuchungen wurden die Hefestämme folgendermaßen vorgezchtet:

Eine Vorzucht in Maltose erwies sich als nötig, da nach einem Substratwechsel von Glucose zu Maltose bei den zu untersuchenden Hefen nach 90 min noch keine Vergärung des Zuckers zu beobachten war. Diese lange Adaptationszeit kann sich ungünstig auf die Genauigkeit der Messungen auswirken, da sich bereits Stoffwechselprodukte von Infektionen bemerkbar machen können. Die Hefen wurden 2 Tage in 10 ml YEP-Lösung bei 29°C im Brutschrank vorgezchtet. Diese 10 cm³ dienten zum Beimpfen von zwei 500 ml Kolben, die je 110 ml YEP-Lösung enthielten, in der die Glucose durch Maltose ersetzt war. Diese Kulturen wuchsen etwa 20 Std in der Schüttelmaschine bei 29°C. Durch die Schüttelkultur ließ sich ein gleichmäßiges Wachstum erreichen. Die haploiden und für den Paarungstyp homozygoten diploiden Stämme neigen dann nicht so stark zur Klumpenbildung.

a) Trockengewicht, Zellzahl und Zellgröße

Nach der Vorzucht in der Schüttelmaschine wurden von jeder Hefe vier Proben zu 50 ml abpipettiert, zentrifugiert, in 1% KCl-Lösung gewaschen und nochmals zentrifugiert. Drei Proben dienten zur Trockengewichtsbestimmung. Die Hefe wurde in 30 ml Wasser aufgeschwemmt, filtriert und in G 4-Fritten 5 Std bei 105°C getrocknet. Von der vierten Probe stellten wir durch Verdünnen die Impfsuspension für die Warburgmessungen her. Die Zelldichte der Suspension wurde mikroskopisch in einer Zählkammer bestimmt. Es wurden jeweils etwa 1000 Zellen ausgezählt. Bei den sporulierenden Stämmen waren Zellzählungen ohne weiteres möglich. Haplonten und homozygote Diplonten wachsen jedoch oft in größeren Sproßverbänden. Die Zellen lassen sich selbst durch Homogenisieren der Suspension nicht voneinander

trennen. Bei diesen Stämmen wurde die flüssige Kultur der Vorzucht durch Watte filtriert. Hierdurch ließ sich eine Suspension aus einzelnen Zellen herstellen, die zur Bestimmung des Trockengewichts, der Zellzahl und der CO₂-Abgabe verwendet werden konnte.

Zur Bestimmung des Volumens und der Oberfläche wurden die Hefen, die unter denselben Bedingungen gewachsen waren wie das zu den Warburgversuchen benutzte Material, photographiert. An jeweils 300 Zellen eines Stammes wurde die Länge = 2a und die Breite = 2b gemessen. Aus den gebildeten Mittelwerten läßt sich das Volumen nach der Formel $V = 4/3 \pi ab^2$ und die Oberfläche nach den Formeln $O = 2 \pi \cdot b \left(b + a \frac{\arcsin \varepsilon}{\varepsilon} \right)$, wobei $\varepsilon = 1/a \cdot \sqrt{a^2 - b^2}$ einzusetzen ist, berechnen.

Versuchsergebnisse

Die Zellgröße wurde von sieben Stämmen der Reihe I bestimmt, die sich nur hinsichtlich des Ploidiegrades und der Paarungstypallele unterschieden; es sind zwei Haplonten vom Paarungstyp a bzw. α , zwei für den Paarungstyp homozygote Diplonten aa und $\alpha\alpha$, ein heterozygoter Diplont αa , ein Triplont $\alpha\alpha a$ und ein Tetraplont $\alpha\alpha\alpha a$. Abb. 1 zeigt Mikroaufnahmen dieser Hefen. Alle Stämmen haben eine elliptische Zellform. Die für Haplonten und homozygote Diplonten charakteristische runde Zellform und Klumpenbildung ist hier bei diesen Stämmen nach Wachstum in maltosehaltigem Nährboden kaum ausgeprägt. In Tab. 3 sind die Werte der Durchmesser, des Volumens, der Oberfläche, des relativen Volumens und der relativen Oberfläche angegeben. Unter relativem Volumen bzw. relativer Oberfläche wird der Quotient zwischen dem Wert des jeweiligen Ploidiegrades und dem des Haplonten verstanden.

Tabelle 3. Durchmesser, Volumen und Oberfläche von sieben Stämmen der Reihe I nach Wachstum in maltosehaltiger YEP-Lösung

Reihe I Stamm	Durchmesser 2a 2b [μ]		Volumen [μ^3]	relatives Volumen Vp/V ₁	Oberfläche [μ^2]	relative Oberfläche Op/O ₁	O/V [μ^2/μ^3]
α	4,4	3,8	33	1	50	1	1,5
a	4,3	3,8	32	1	50	1	1,5
$\alpha\alpha$	5,7	4,5	60	1,8	77	1,5	1,3
aa	5,6	4,4	57	1,7	75	1,5	1,3
αa	6,5	4,9	82	2,5	99	1,9	1,2
$\alpha\alpha a$	7,1	5,1	97	2,9	107	2,2	1,1
$\alpha\alpha\alpha a$	8,3	5,5	132	4,0	132	2,6	1,0

Es ist nun die Frage, ob die Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen als gesichert angesehen werden können. Besonders notwendig erscheint dies für den Vergleich der Durchmesser des heterozygoten Diplonten mit denen des homozygoten Diplonten und des Triplonten. Es wurden daher mit Hilfe des „t-Tests“ von STUDENT (siehe WEBER 1957) die Differenzen zwischen den Mittelwerten des αa -Diplonten und des

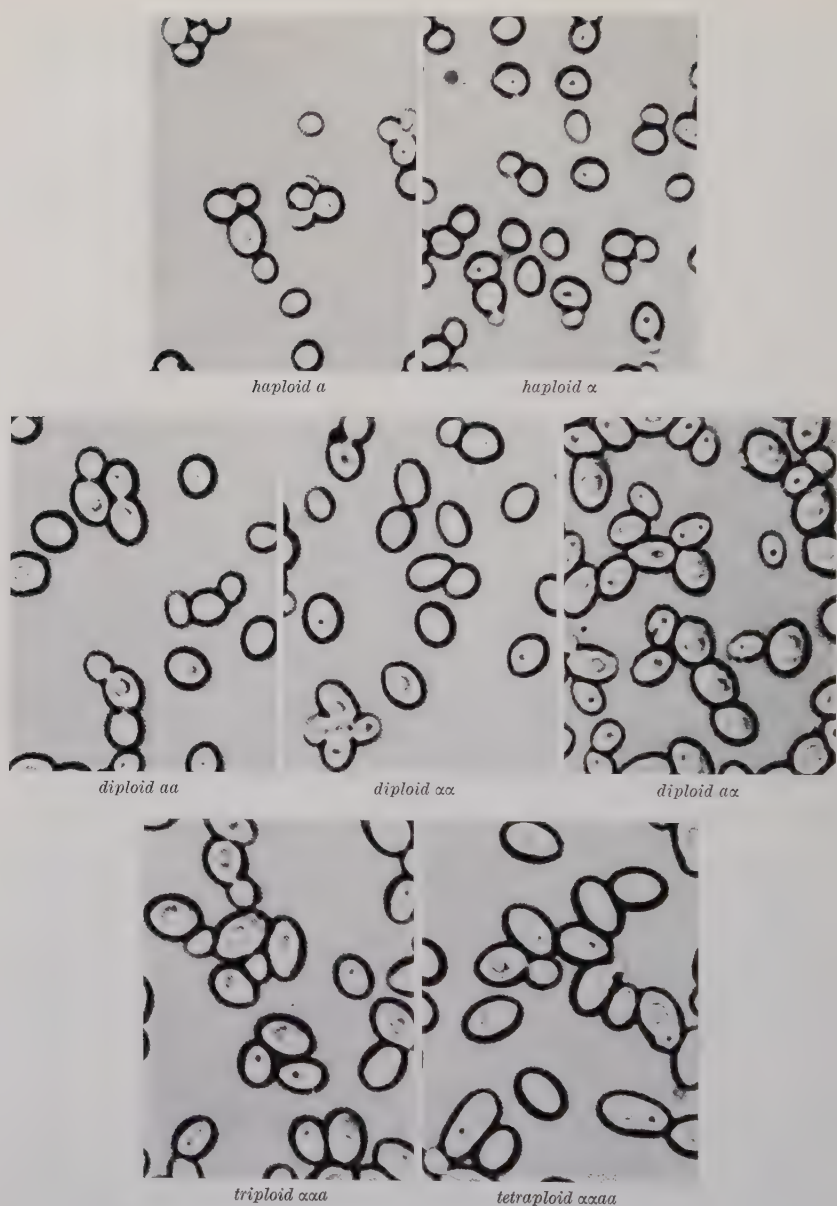


Abb.1. Mikrophotographien der sieben für die Untersuchungen verwendeten Stämme der Reihe I.
Vergr. 1:880

$\alpha\alpha$ -Diplonten sowie des $\alpha\alpha$ -Diplonten und des Triplonten auf Signifikanz geprüft. Voraussetzung für die Anwendbarkeit des Testes ist, daß die Einzelkollektive der Normalverteilung folgen. Eine graphische Kontrolle

der Werte durch Eintragung der $\Sigma\%$ in ein sogenanntes Wahrscheinlichkeitsnetz (Schl. & Sch. Nr. 298^{1/2}) mit numerisch geteilter Abszisse und nach dem Gaußschen Integral geteilter Ordinate ergab, daß die Verteilung der Werte innerhalb eines Stammes etwa der einer Normalverteilung entsprach. Beim Prüfen der Unterschiede zwischen den Durchmessern der einzelnen Stämme wurden die folgenden „t-Werte“ berechnet:

$$2a_{aa} - 2a_{aa} = 0,8; \quad t = 10,7$$

$$2b_{aa} - 2b_{aa} = 0,4; \quad t = 10,2$$

$$2a_{aaa} - 2a_{aa} = 0,6; \quad t = 7,5$$

$$2b_{aaa} - 2b_{aa} = 0,2; \quad t = 5,0$$

Einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% entspricht hier ein „t-Wert“ von 2,58. Da jeder der gefundenen „t-Werte“ größer ist als $t_{0,01} = 2,58$, sind die vorliegenden Unterschiede zwischen den Stämmen signifikant.

Das Volumen der Zellen steigt etwa proportional dem Polyploidiegrad an. Es fällt jedoch auf, daß das Volumen der beiden homozygoten diploiden Stämme etwa nur $\frac{3}{4}$ des Volumens des heterozygoten Diplonten beträgt. Da von LASKOWSKI (1960) für diese Stämme bereits Untersuchungen über das Zellvolumen nach Wachstum in glucosehaltigem Nährboden vorliegen, konnten die Werte verglichen werden. Die für die Haplonten, den heterozygoten Diplonten, den Tri- und den Tetraplonten gefundenen Werte stimmen mit den von LASKOWSKI angegebenen recht gut überein. Das Volumen des homozygoten Diplonten erwies sich als ebenso groß wie das des heterozygoten. Es ist daher anzunehmen, daß das kleinere Volumen der homozygoten Diplonten nach Wachstum in maltosehaltigem Nährboden eine Folge der veränderten Kohlenhydratquelle ist, besonders da die Volumenverminderung mit einer Formveränderung einhergeht. Die in Glucose gezüchteten, für den Paarungstyp homozygoten Diplonten hatten die Durchmesser 5,7/5,0; nach Kultur in Maltose wurden die Werte 5,7/4,5 gefunden, hier ist der Längen-Breiten-Index also höher. Mit zunehmendem Volumen vergrößert sich auch die Oberfläche der Zellen. Diese Zunahme beträgt vom Haplonten bis zum Tetraplonten das 2,6fache. Der Quotient Oberfläche/Volumen sinkt also mit steigender Genomzahl vom Haplonten bis zum Tetraplonten um ein Drittel.

In Tab. 4 sind das Trockengewicht/Zelle in mg/10⁸ Zellen, das relative Trockengewicht und das Trockengewicht/Volumen von den Stämmen der Reihe I zusammengefaßt, bei denen Zellzählungen möglich waren. Als Trockengewicht/Zelle ist ein aus zehn unabhängigen Versuchen gebildeter Mittelwert und der mittlere Fehler desselben angegeben. Unter relativem Trockengewicht wird der Quotient zwischen dem Wert des jeweiligen Polyploidiegrades und dem des Haplonten verstanden.

Das Trockengewicht des Diplonten beträgt das Doppelte des Haplonten, auch das des Triplonten entspricht noch etwa dem zu erwartenden

Tabelle 4. *Trockengewicht/Zelle, relatives Trockengewicht und Trockengewicht/Volumen von fünf Stämmen der Reihe I nach Wachstum in maltosehaltiger YEP-Lösung*

Reihe I Stamm	Tr/Zelle mg/10 ⁸ Zellen	relatives Tr Tr _p /Tr ₁	Tr/V mg/mm ³
α	1,32 $\pm$ 0,08	1	0,40
$\alpha\alpha$	2,47 $\pm$ 0,07	1,9	0,41
$\alpha\alpha$	2,82 $\pm$ 0,02	2,1	0,34
$\alpha\alpha\alpha$	3,62 $\pm$ 0,05	2,7	0,37
$\alpha\alpha\alpha\alpha$	4,46 $\pm$ 0,08	3,4	0,34

Dreifachen des Haplonten, während der Tetraplont nur das 3,4fache an Trockensubstanz enthält. Bezieht man das Trockengewicht auf das Volumen, so ergibt sich ein Trockensubstanzgehalt von 34–41%. Diese Werte erscheinen ziemlich hoch. Für Preßhefe werden jedoch von Cook (1958) bis zu 35% Trockengewicht angegeben. Hier ist das extracelluläre Wasser nicht berücksichtigt, so daß für das reine Zellgewicht durchaus bis zu 40% Trockensubstanz zu erwarten wären, besonders da die Genauigkeit der Werte nicht mehr als $\pm 10\%$ beträgt. Der Unterschied zwischen den Gruppen der homozygoten und der heterozygoten Stämme kann daher auch nicht als signifikant angesehen werden.

Für vier Stämme der Reihe II, einen Haplonten mit dem Paarungstyp α , einen Diplonten $\alpha\alpha$, einen Diplonten $\alpha\alpha$ und einen Triplonten $\alpha\alpha\alpha$, sind die Werte der Durchmesser des Volumens, der Oberfläche, des relativen Volumens und der relativen Oberfläche sowie des Verhältnisses Oberfläche/Volumen in Tab. 5 enthalten. Das Volumen der Zellen steigt

Tabelle 5. *Durchmesser, Volumen und Oberfläche von vier Stämmen der Reihe II nach Wachstum in maltosehaltiger YEP-Lösung*

Reihe II Stamm	Durchmesser 2a	2b	Volumen [μ^3]	relatives Volumen V _p /V ₁	Oberflächen [μ^2]	relative Oberflächen Op/O ₁	O/V [μ^2/μ^3]
α	4,9	4,3	49	1	66	1	1,3
$\alpha\alpha$	6,8	5,2	97	2,0	106	1,6	1,1
$\alpha\alpha$	6,9	5,3	104	2,1	112	1,7	1,1
$\alpha\alpha\alpha$	7,1	6,0	135	2,8	131	2,0	1,0

auch bei dieser Reihe proportional der Genomzahl an. Der Unterschied von 7 μ^3 zwischen dem homozygoten und dem heterozygoten Diplonten kann nicht als signifikante Abweichung betrachtet werden, so daß hier kein gesicherter Größenunterschied zwischen den beiden diploiden Stämmen vorliegt. Die Volumina sämtlicher Stämme der Reihe II sind um etwa 30% größer als die der Reihe I. Die Zunahme der Oberflächen ist jedoch etwas geringer, so daß der Quotient Oberfläche/Volumen der einzelnen Polyploidiestufen kleiner ist als bei der Reihe I.

In Tab. 6 sind das Trockengewicht/Zelle, das relative Trockengewicht und das Trockengewicht/Volumen von vier Stämmen der Reihe II zusammengefaßt. Das Trockengewicht nimmt auch hier proportional dem Polyploidiegrad zu. Der Trockensubstanzgehalt je Volumen stimmt innerhalb der Fehlergrenzen für alle Stämme überein und entspricht den für die Reihe I gefundenen Werten.

Tabelle 6. *Trockengewicht/Zelle, relatives Trockengewicht und Trockengewicht/Volumen von vier Stämmen der Reihe II*

Reihe II Stamm	Tr/Zelle mg/10 ⁸ Zellen	relatives Tr. Tr _p /Tr ₁	Tr/V mg/mm ³
α	1,91 $\pm$ 0,12	1	0,39
$\alpha\alpha$	3,50 $\pm$ 0,11	1,8	0,36
αa	3,60 $\pm$ 0,07	1,9	0,33
$\alpha\alpha a$	5,15 $\pm$ 0,09	2,7	0,38

In der folgenden Zusammenfassung der Ergebnisse über das Volumen und das Trockengewicht/Zelle sollen diese Befunde mit denen früherer Arbeiten verglichen werden. Es werden hierbei auch die Werte von den Messungen an dem Haplonten $MRA_2\alpha$ und dem Diplonten $MRA_2\alpha a$ herangezogen. Für das Volumen und das Trockengewicht sind die Bereiche zusammengestellt, über die sich die Werte der Stämme mit derselben Genomzahl erstrecken. In Klammern sind die entsprechenden Werte bei anderen Autoren angegeben, die Volumina nach MORTIMER (1958) und das Trockengewicht je Zelle nach SARACHEK (1958).

Tabelle 7

	Volumen μ^3	T. S./Zelle mg/10 ⁸
Haplonten	26—49 (38—54)	1,04—1,91 (1,16—1,32)
Diplonten	57—104 (75—98)	2,47—3,60 (2,22—2,80)
Triplonten	97—135 (125—162)	2,62—5,15 (3,31—3,87)
Tetraplonten	132 (165)	446 (430)

Die stammspezifischen Unterschiede innerhalb einer Genomstufe sind teilweise größer als die zwischen den Kernwertigkeitsgraden. Angesichts dieser großen Variationsbreite weniger Stämme kann eine vollständige Übereinstimmung mit den von MORTIMER und SARACHEK angegebenen Werten nicht erwartet werden. Die Größenordnungen sind jedoch vergleichbar.

b) Vergärung von Glucose und Maltose

Die Messungen wurden in einem Warburgapparat bei 30°C vorgenommen. Die Kapazität der Manometer beträgt etwa 200 μ l CO₂. Die Impfsuspension wurde so eingestellt, daß bei einer Meßdauer von 45 min die CO₂-Abgabe nicht größer als etwa $\frac{3}{4}$ der Kapazität ist. Unter dieser Bedingung enthielt die Impfsuspension für die Maltosegärung etwa 1 mg Trockensubstanz und für Glucose 0,5 mg je ml. Die Messungen wurden bei einem pH-Wert von 5 vorgenommen. Der Phosphatpuffer hatte folgende Zusammensetzung: 0,95 ml 1,187%ige Na₂HPO₄-Lösung und 99,05 ml 0,9078%ige KH₂PO₄-Lösung. Jedes Warburgkölbchen wurde im Gefäß mit 1 ml Phosphatpuffer und 1 ml Hefesuspension gefüllt. Der Innenring enthielt 0,2 ml Wasser und der Seitenarm 0,5 ml 5%ige Maltose- bzw. Glucoselösung oder Wasser. Von jeder aus einer Vorzucht stammenden Hefe wurde für jeden Zucker die CO₂-Abgabe in drei Parallelansätzen geprüft. Als Blindwerte dienten drei weitere Proben, die statt der Zuckerlösung Wasser enthielten. Druckänderungen, die durch Stoffwechselvorgänge ohne Zucker hervorgerufen werden, können so erfaßt werden. Die Werte für die Zuckervergärung lassen sich dann korrigieren. Es wurde unter Schütteln 10 min mit Reinstickstoff begast, der noch über Kupfer geleitet wurde, um ihn von allen Sauerstoffspuren zu befreien. Anschließend wurde die Zuckerlösung eingekippt und weitere 5 min begast. Dann wurde mit den Messungen begonnen und alle 15 min der Manometerstand abgelesen.

Ergebnisse der Vorversuche

Ergebnisse von Stämmen verschiedenen Polyploidiegrades können nur unter der Voraussetzung verglichen werden, daß sich die Kulturen der Stämme während der Messung im gleichen physiologischen Zustand befinden. Dies läßt sich nur durch eine geeignete Vorzucht erreichen. Um einen Einblick in das Wachstum der polyploiden Stämme während der Vorzucht zu gewinnen, wurden Wachstumskurven vom α -Diplonten, dem Triplonten und dem Tetraplonten der Reihe I aufgenommen. Hierfür wurden die Hefen in 110 ml YEP-Lösung + Maltose in der Schüttelmaschine bei 29°C gezüchtet. Die Anfangskeimzahl der Kulturen betrug rund $5,4 \cdot 10^5$ Zellen. Alle 2 Std wurden Proben genommen und die Zellzahl bestimmt. Die Versuchsergebnisse sind in Abb. 2 dargestellt. Die Zellzahl ist im logarithmischen Maßstab gegen die Zeit aufgetragen.

Alle drei Hefen haben während der logarithmischen Wachstumsphase dieselbe Wachstumsrate. Nach 16 Std wird vom Tetraplonten der Übergang von der logarithmischen zur stationären Phase erreicht, während die logarithmische Phase des Diplonten noch 1 Std länger dauert. Die Proben für die Warburgmessungen wurden für alle Stämme am gleichen Punkt der Kurve entnommen, 2 Std nach dem Übergang in die stationäre Phase. Die Zeit der Vorzucht betrug dann für den Tetraplonten 19 Std, für den Triplonten 19 $\frac{1}{2}$ und für den Diplonten 20 Std. Zu diesem Zeitpunkt war in den Kulturen der verschiedenen Stämme dieselbe Menge Trockensubstanz gebildet, etwa 260–275 mg in 50 ml Suspension. Bei den Haplonten und homozygoten Diplonten waren keine Zellzählungen möglich. Daher wurde die Länge der Vorzucht so eingestellt, daß auch diese

Stämme dieselbe Menge Trockensubstanz gebildet hatten wie die Polyplonten. Für die homozygoten Diplonten waren hierfür $21\frac{1}{2}$ und für Haplonten 22 Std Schüttelkultur notwendig. In einigen Vorversuchen wurden jedoch auch die Bedingungen der Vorzucht geändert, um einen Überblick über den Einfluß der Vorzucht auf die Gärintensität der einzelnen Stämme zu gewinnen.

Die Ergebnisse der Warburgmessungen zeigten, daß nach Bildung einer bestimmten Menge an Trockensubstanz unabhängig von der Zeit,

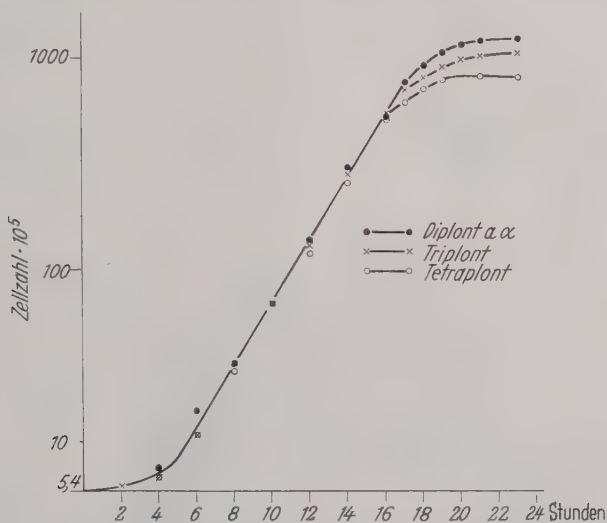


Abb. 2. Wachstumskurve von drei Stämmen der Reihe I. Substrat: Maltose

Temperatur und Schüttelfrequenz bei der Vorzucht für eine Hefe etwa die gleichen Werte für die CO_2 -Abgabe je Milligramm Trockengewicht erzielt wurden. Die Geschwindigkeit, mit der die Maltose vergoren wird, ist davon abhängig, wieviel Trockensubstanz in der Vorzucht gebildet war, während die Glucosevergärung sich nicht ändert. Es wurden Proben von verschiedenen Phasen der Wachstumskurve entnommen, um zu klären, ob die Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen sich auch in anderen Stadien der stationären Phase ausprägen. Für die Stämme α , $\alpha\alpha$ und αa der Reihe I wurden Versuche mit drei verschiedenen Vorzuchten angesetzt. Bei der ersten Vorzucht waren 230 mg Trockensubstanz in 50 ml Suspension gebildet, bei der zweiten 260–275 mg, bei der dritten 310 mg. In den Tab. 8 und 9 ist die CO_2 -Abgabe in μl je Stunde bezogen, auf 1 mg Trockensubstanz angegeben, als Substrat lagen Maltose bzw. Glucose vor.

Tabelle 8. *Maltosevergärung von drei Stämmen der Reihe I in verschiedenen Stadien der Wachstumskurve (vgl. Text)*

Reihe I Stamm	CO ₂ -Abgabe in μ l		
	1. Vorzucht	2. Vorzucht	3. Vorzucht
α	141	112	66
$\alpha\alpha$	148	115	70
αa	192	153	90

Tabelle 9. *Glucosevergärung von drei Stämmen der Reihe I in verschiedenen Stadien der Wachstumskurve (vgl. Text)*

Reihe I Stamm	CO ₂ -Abgabe in μ l		
	1. Vorzucht	2. Vorzucht	3. Vorzucht
α	245	240	244
$\alpha\alpha$	270	275	280
αa	255	260	250

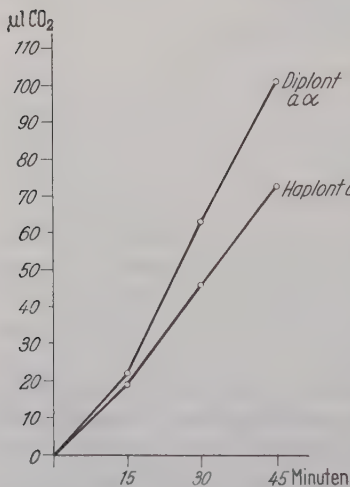


Abb. 3

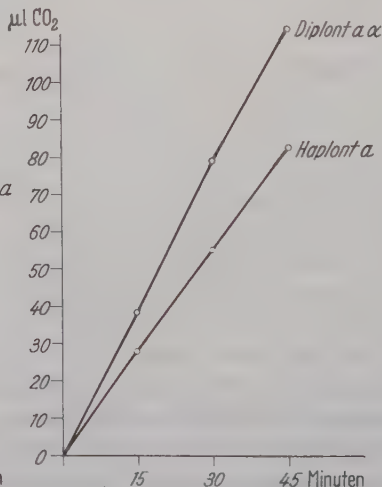


Abb. 4

Abb. 3 und 4. CO₂-Abgabe je 1 mg T.S. von zwei Stämmen der Reihe I, Substrat: Maltose. Bei Abb. 3 erfolgte die erste Ablesung sofort nach Zugabe des Zuckers zur Zellsuspension. Bei Abb. 4 wurde zwischen Zuckergabe und Ablesung 5 min mit N₂ begast

Die Geschwindigkeit, mit der die Maltose vergoren wird, nimmt im Laufe der stationären Phase ab, während die der Glucosevergärung konstant bleibt. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Hefen waren jedoch unter der Bedingung, daß gleiche Mengen Trockensubstanz während der Vorzucht gebildet waren, dieselben.

Eine gleichmäßige Vergärung während der Meßdauer von 45 min ließ sich durch folgende Versuchsanordnung erreichen. Wird sofort nach dem

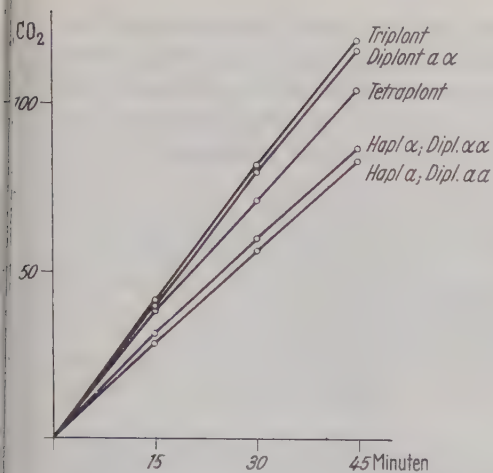


Abb. 5

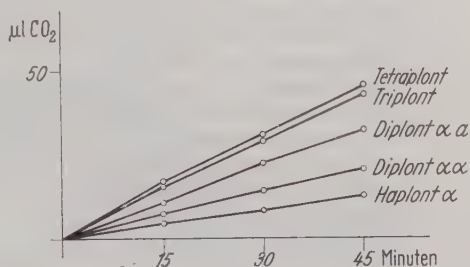


Abb. 7

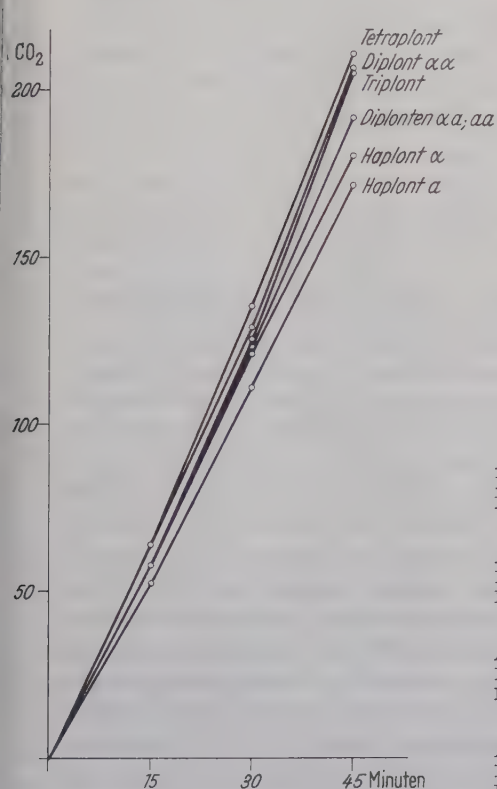


Abb. 6

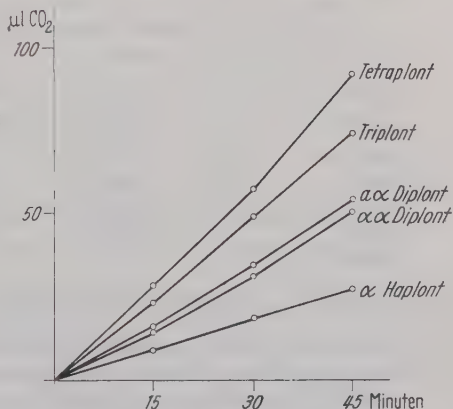


Abb. 8

Abb. 5. CO_2 -Abgabe/1 mg T.S. von sieben Stämmen der Reihe I. Substrat: Maltose. Die Kurvenpunkte sind Mittelwerte aus zehn unabhängigen Messungen. Der mittlere Fehler beträgt $\pm 3 \mu\text{l}$

Abb. 6. CO_2 -Abgabe/1 mg T.S. von sieben Stämmen der Reihe I. Substrat: Glucose. Die Kurvenpunkte sind Mittelwerte aus zehn unabhängigen Messungen. Der mittlere Fehler beträgt $\pm 6 \mu\text{l}$

Abb. 7. CO_2 -Abgabe/ 10^7 Zellen von fünf Stämmen der Reihe I. Substrat: Maltose. Die Kurvenpunkte sind Mittelwerte aus zehn unabhängigen Messungen. Der mittlere Fehler beträgt $\pm 1 \mu\text{l}$

Abb. 8. CO_2 -Abgabe/ 10^7 Zellen von fünf Stämmen der Reihe I. Substrat: Glucose. Die Kurvenpunkte sind Mittelwerte aus zehn unabhängigen Messungen. Der mittlere Fehler beträgt $\pm 2 \mu\text{l}$

Einkippen des Zuckers der Nullpunkt abgelesen, ist die Vergärung während der ersten 15 min geringer als während der nächsten. Eine gleichmäßige Gärgeschwindigkeit wurde erzielt, indem nach Zusammenbringen des Zuckers mit der Hefe die Kölbchen noch 5 min mit N_2 begast wurden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Abb. 3 und 4 dargestellt.

Ergebnisse der Versuchsreihen

Für jeden der sieben Stämme der Reihe I wurde in zehn Parallelversuchen mit jeweils einer neuen Vorzucht die Glucose- und Maltosevergärung gemessen. Die Ergebnisse sind in den Abb. 5–8 zusammengefaßt, wobei jeder Kurvenpunkt ein aus den zehn Messungen gebildeter Mittelwert ist. In Abb. 5 und 6 sind die μl CO_2 , die je 1 mg T.S. abgegeben wurden, gegen die Zeit aufgetragen, in Abb. 7 und 8 ist die CO_2 -Abgabe je 10^7 Zellen eingezeichnet. Tab. 10 enthält eine Zusammenstellung der Werte für die CO_2 -Abgabe bei der Glucose- und Maltosevergärung in 1 Std je 1 mg Trockensubstanz und 10^7 Zellen.

Tabelle 10. Die CO_2 -Abgabe in μl je 1 mg T.S. und 10^7 Zellen in 1 Std bei den Stämmen der Reihe I

Reihe I Stamm	CO_2 -Abgabe/1 mg T.S.		CO_2 -Abgabe/ 10^7 Zellen	
	Glucose	Maltose	Glucose	Maltose
α	240	115	32	15
a	228	108	—	—
$\alpha\alpha$	273	115	67	28
aa	256	108	—	—
αa	256	153	73	43
$\alpha\alpha a$	275	158	100	57
$\alpha\alpha a a$	280	138	123	60

Tabelle 11. Varianzen der sieben Stämme der Reihe I für die Werte der CO_2 -Abgabe/1 mg T.S. in 45 min

Stamm	α	a	$\alpha\alpha$	aa	αa	$\alpha\alpha a$	$\alpha\alpha a a$
Varianz Maltose	45,4	62,7	76,7	43,7	97,1	59,0	62,0
Varianz Glucose	292,5	201,5	157,3	257,8	96,5	63,7	292,0

Um zu prüfen, ob es sich um statistisch zu sichernde Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen handelt, wurden die Werte einer Varianzanalyse nach FISCHER (siehe WEBER 1957) unterworfen. Daß die Varianzen innerhalb der Gruppen, also die Versuchsfehler, gleich groß sind, wurde mit Hilfe des Bartlett-Tests (siehe WEBER) nachgewiesen. Die Varianzen der Gruppen, d.h. der einzelnen Stämme, sind in Tab. 11 angegeben. Den Berechnungen sind die Werte für die CO_2 -Abgabe in 45 min je 1 mg Trockensubstanz bei der Vergärung von Glucose und Maltose zugrunde gelegt.

Die höhere Varianz bei den Werten für Glucose beruht nicht auf einem größeren Versuchsfehler bei den Messungen, sondern entsteht durch die Berechnung der CO_2 -Abgabe auf 1 mg Trockensubstanz. Da nur etwa 0,5 mg Trockensubstanz zur Bestimmung verwendet wurden, mußte mit dem Faktor 2 multipliziert werden. Da sich für die Varianzen $\chi^2_0 = 2,70$ $P \sim 85\%$ (Maltose) und $\chi^2_0 = 8,03$ $P \sim 25\%$ (Glucose) ergaben, sind die Unterschiede zwischen den Gruppenvarianzen nur Zufallsunterschiede. Die Varianzanalyse führte zu folgenden „F-Werten“:

$$F = \frac{\text{Varianz zwischen den Stämmen}}{\text{Varianz innerhalb der Stämme}}$$

$$F_{\text{Maltose}} = \frac{2509}{63,7} = 39,4 \quad F_{\text{Glucose}} = \frac{2058}{194,5} = 10,6$$

Für $P = 1\%$ ergibt sich $F_{0,01} = 3,10$. Da $F > F_{0,01}$ ist, sind bei der Vergärung beider Zucker gesicherte Unterschiede zwischen einigen Stämmen vorhanden.

Hinsichtlich der Maltosevergärung je Trockengewicht besteht zwischen den beiden Gruppen der sporulierenden und der kopulierenden Hefen ein deutlicher Unterschied. Die Werte für die Haplonten und homozygoten Diplonten stimmen sehr gut überein. Bei den heterozygoten Hefen entsprechen sich der Diplont und der Triplont, während der Tetraplont abweicht, indem er etwas langsamer gärt. Die Differenz zwischen dem Tetraplonten und den homozygoten Hefen ist signifikant, ebenfalls die zwischen dem Tetraplonten und den anderen heterozygoten Hefen, so daß zwar alle sporulierenden Stämme stärker gären als die kopulierenden, jedoch nicht in gleichem Maße.

Bei der Vergärung von Glucose verhalten sich die Stämme anders. Die CO_2 -Abgabe nimmt von den Haplonten bis zum Tetraplonten zu. Gegenüber den Haplonten ergibt sich eine signifikant höhere CO_2 -Abgabe des $\alpha\alpha$ -Diplonten, des Triplonten und des Tetraplonten. Die Diplonten $\alpha\alpha$ und aa sind nur dem Haplonten a überlegen, die Differenz zum Haplonten α läßt sich statistisch nicht sichern. Die Unterschiede zwischen den Diplonten aa , $\alpha\alpha$ und αx sind nicht signifikant. Bei der Vergärung von Glucose ist keine statistisch gesicherte Differenz zwischen der Gruppe der homozygoten und der heterozygoten Stämme nachweisbar.

Für die fünf Stämme, bei denen die Zellzahl der Impfsuspensionen bestimmt wurde, war die Berechnung der CO_2 -Abgabe/ 10^7 Zellen möglich. Bei dem Haplonten α und dem homozygoten Diplonten $\alpha\alpha$ waren Zellzählungen jedoch nur an filtriertem Material durchführbar. Es war daher zu klären, ob durch das Filtrieren eine Zellsuspension erhalten wurde, deren Gärintensität noch der des Ausgangsmaterials entsprach. Für diese beiden Stämme wurden je drei Warburgmessungen mit filtrierten Suspensionen vorgenommen. Die Werte stimmten jedoch mit den übrigen für

den Haplonten und Diplonten überein, so daß auch für diese beiden Stämme Angaben über die CO_2 -Entwicklung je Zelle gemacht werden konnten.

Liegt Glucose als Substrat vor, so steigt die CO_2 -Abgabe proportional der Genomzahl. Heterozygoter und homozygoter Diplont stimmen überein. Bei der Maltosevergärung zeigt sich keine so gleichmäßige Zunahme

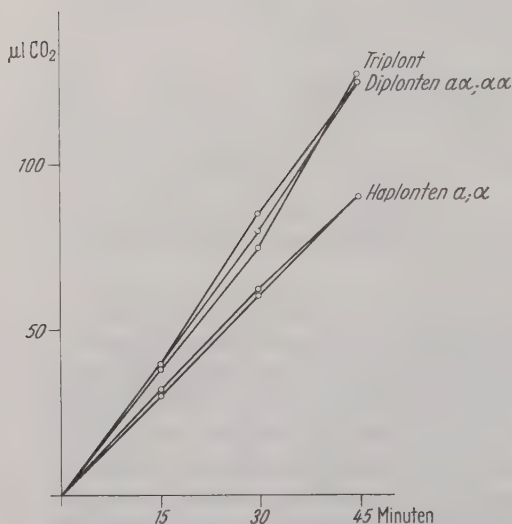


Abb. 9. CO_2 -Abgabe/1 mg T.S. von fünf Stämmen der Reihe II. Substrat: Maltose. Die Kurvenpunkte sind Mittelwerte aus fünf unabhängigen Messungen. Der mittlere Fehler beträgt $\pm 4 \mu\text{l}$

der Aktivität. Der homozygote Diplont vergärt Maltose 1,9 mal so schnell wie der Haplont, was einer der Kernwertigkeit proportionalen Steigerung entspricht, während die Zellen des heterozygoten Diplonten etwa die dreifache Menge CO_2 entwickeln wie die des Haplonten. Der Triplont mit 3,8facher Aktivität unterscheidet sich kaum vom Tetraplonten, der wieder in Übereinstimmung mit dem Polyploidiegrad eine vierfache CO_2 -Abgabe aufweist. Die Geschwindigkeit, mit der eine Zelle Maltose vergären kann, ist also nicht nur vom Polyploidiegrad abhängig, sondern wird darüber hinaus noch von anderen Faktoren beeinflusst. Der Unterschied

zwischen heterozygoten und homozygoten Diplonten weist auf eine biochemische Parallele zum „ $\alpha\alpha$ -Effekt“ hin, während die übereinstimmende CO_2 -Entwicklung des Triplonten und Tetraplonten vielleicht darauf zurückzuführen ist, daß für diese Hefe beim Triplonten bereits die größte mögliche Aktivität je Zelle erreicht ist, so daß eine Erhöhung der Kernwertigkeit keine weitere Steigerung der Gärintensität zur Folge haben kann.

Zu weiteren Versuchen wurden fünf Stämme der Reihe II herangezogen, deren haploider Ausgangsstamm *dia-6H* drei Maltose-Gene enthielt. Auch hier wurde die Dauer der Vorzucht für die einzelnen Stämme in einigen orientierenden Vorversuchen bestimmt. Die Vorzucht wurde zu dem Zeitpunkt abgebrochen, an dem der jeweilige Stamm etwa 270 mg Trockengewicht/50 ml gebildet hatte, so daß die Ergebnisse der Warburgmessungen mit denen für die Reihe I verglichen werden können. Es ergaben sich die folgenden Vorzuchtzeiten: 19 Std für den Triplonten,

19 $\frac{1}{2}$ für beide Diplonten und 21 Std für beide Haplonten. Die Maltose- und Glucosevergärung wurde für jeden der fünf Stämme der Reihe II in fünf Wiederholungen gemessen. Abb. 9—12 zeigen die Ergebnisse dieser

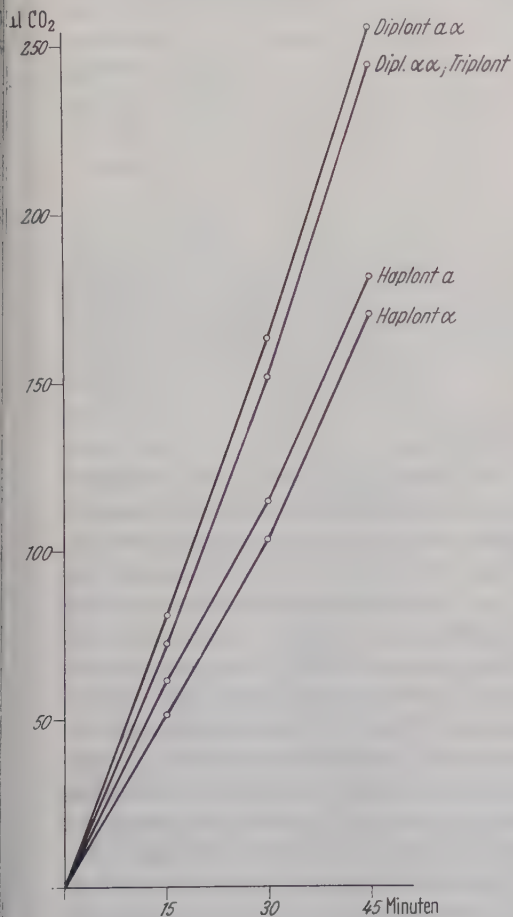


Abb. 10. CO₂-Abgabe/1 mg T.S. von fünf Stämmen der Reihe II. Substrat: Glucose. Die Kurvenpunkte sind Mittelwerte aus fünf unabhängigen Messungen. Der mittlere Fehler beträgt $\pm 7 \mu$

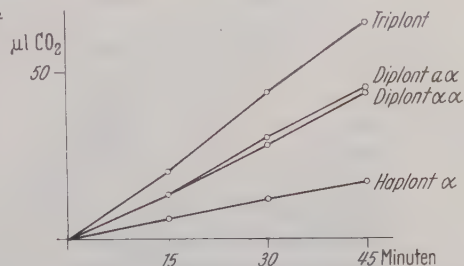


Abb. 11. CO₂-Abgabe/10⁷-Zellen von vier Stämmen der Reihe II. Substrat: Maltose. Die Kurvenpunkte sind Mittelwerte aus fünf unabhängigen Messungen. Der mittlere Fehler beträgt $\pm 2 \mu$

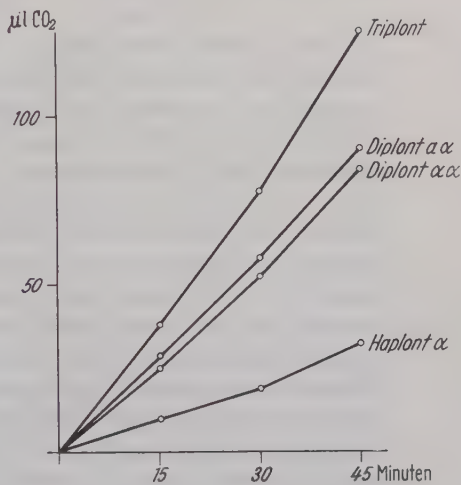


Abb. 12. CO₂-Abgabe/10⁷ Zellen von vier Stämmen der Reihe II. Substrat: Glucose. Die Kurvenpunkte sind Mittelwerte aus fünf unabhängigen Messungen. Der mittlere Fehler beträgt $\pm 3 \mu$

Versuche. Die Werte für die CO₂-Abgabe je Stunde, bezogen auf 1 mg Trockensubstanz bzw. 10⁷ Zellen, sind der Tab. 12 zu entnehmen.

Die Vergärung beider Zucker verläuft bei den Haplonten bedeutend langsamer als bei den übrigen Stämmen. Zwischen dem homozygoten und dem heterozygoten Diplonten und dem Triplonten sind bei der CO₂-Abgabe/Trockengewicht keine gesicherten Unterschiede vorhanden. Auf

Tabelle 12

Die CO_2 -Abgabe in μl je 1 mg T.S. und 10^7 Zellen in 1 Std bei den Stämmen der Reihe II

Reihe II Stamm	CO_2 -Abgabe/1 mg T.S.		CO_2 -Abgabe/ 10^7 Zellen	
	Glucose	Maltose	Glucose	Maltose
a	242	120		
α	228	119	44	23
$\alpha\alpha$	325	167	113	58
$\alpha\bar{a}$	336	168	117	60
$\alpha\alpha\bar{a}$	327	169	168	87

die Zellzahl bezogen entwickeln die Diplonten die 2,5--2,6fache und der Triplont die 3,8fache Menge CO_2 wie die Haplonten. Die Diploidisierung des Stammes *dia-6H* hat also eine Steigerung der Aktivität bei der Vergärung zur Folge, die über den der Genomzahl proportionalen Anstieg hinausgeht. Die CO_2 -Abgabe des Diplonten verhält sich jedoch zu der des Triplonten wie 2:3.

Diskussion

Die Untersuchungen über die Vergärungsgeschwindigkeit bei homozygoten Hefestämmen mit verschiedenen Genomzahlen haben gezeigt, daß mit der Vervielfachung der Chromosomensätze eine Leistungssteigerung der Zelle einhergeht. Einen Überblick über die relative Zunahme des Volumens, der Trockensubstanz und der CO_2 -Abgabe/Zelle bei der Glucose- und Maltosevergärung innerhalb einer isogenen Reihe geben die Abb. 13—15. Die Werte für die Haplonten wurden gleich 1 gesetzt, die der übrigen Stämme darauf bezogen und dann über den in der Abszisse angegebenen Genomzahlen eingetragen. Aus den Kurven können die Abweichungen von einem dem Ploidiegrad proportionalen bzw. linearen Anstieg abgelesen werden. Anschließend sollen die Auswirkungen des Kernwertigkeitsgrades auf die vier geprüften Eigenschaften bei beiden Reihen verglichen werden. Der haploide Ausgangsstamm der Reihe I enthält das Maltose-Gen M_1 . Der Haplont der Reihe II hat drei Maltose-Gene M_1 und M_5 und ein weiteres Maltose-Gen, von dem noch nicht endgültig bestimmt werden konnte, ob es mit einem der sechs bekannten identisch ist.

Trockengewicht und Volumen steigen in beiden Reihen etwa proportional mit der Genomzahl an. Eine Ausnahme bildet nur das Volumen des für den Paarungstyp heterozygoten Diplonten der Reihe I, das mit dem 2,5fachen des Haplonten höher als erwartet liegt, so daß ein signifikanter Unterschied zum homozygoten Diplonten vorhanden ist. Es scheint sich hier auch in der Größe eine Parallelerscheinung zum „ α -Effekt“ widerzuspiegeln. Hinsichtlich der Veränderungen in der Gärintensität zeigen die beiden Reihen keine Übereinstimmung. Für die Reihe I ist bei

der Glucosevergärung eine gleichmäßige Steigerung um das 2-, 3- und 4fache von einer Kernwertigkeitsstufe zur anderen vorhanden, unabhängig von der Kombination der Paarungstypallele. Für die CO_2 -Abgabe bei der Vergärung von Maltose ist nur bei dem $\alpha\alpha$ -Diplonten und dem Tetraplonten der Reihe I ein den Genomzahlen proportionaler Anstieg vorhanden. Der heterozygote Diplont und der Triplont zeigen mit der 2,8- bzw. 3,8fachen CO_2 -Entwicklung je Zelle eine schnellere Vergärung als der Anzahl der Chromosomensätze entspricht. Hier fällt auch auf, daß in der Reihe I für den heterozygoten Diplonten und den Triplonten eine besonders ungleichmäßige Steigerung in den geprüften Merkmalen auftritt, während dies bei dem homozygoten Diplonten nicht der Fall ist und bei dem Tetraplonten nur das Trockengewicht etwas nach unten abweicht. Dies deutet darauf hin, daß die quantitativen Änderungen, zum mindesten in gewissem Maße, unabhängig voneinander erfolgen. Bei beiden Diplonten und dem Triplonten der Reihe II stimmt die relative Steigerung der CO_2 -Entwicklung aus beiden Zuckern überein, die Zunahme geht jedoch über die des Volumens und des Trockengewichtes hinaus.

Wird die CO_2 -Abgabe auf 1 mg Trockensubstanz bezogen, so ergibt sich, daß alle Haplonten dieselbe Aktivität bei der Glucose- bzw. Maltosevergärung haben. Die unterschiedliche genetische Konstitution bedingt demnach bei den Haplonten keine quantitativen Unterschiede in der Merkmalsausbildung, soweit sie die Vergärung der beiden Zucker bei diesen

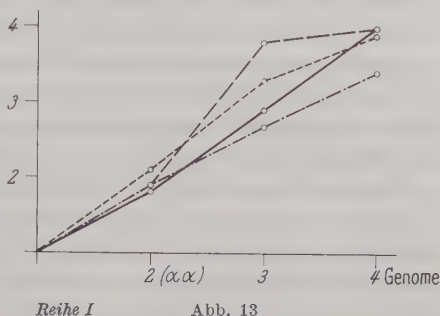


Abb. 13

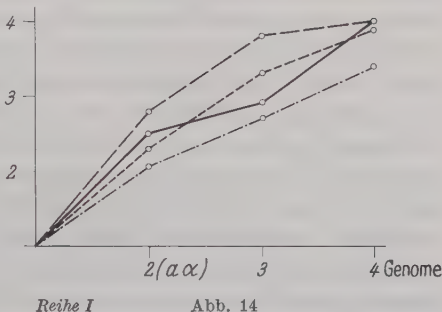


Abb. 14

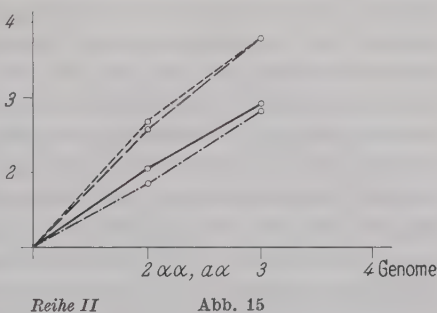


Abb. 15

Abb. 13–15. Die relative Zunahme der Volumina, der CO_2 -Abgabe und des Trockengewichtes je Zelle bei verschiedenen Stämmen der homologen Reihen I und II. — Volumen, - - - Trockengewicht, - · - · CO_2 -Abgabe Glucose, — — — CO_2 -Abgabe Maltose

Stämmen betrifft. Die Volumina und die Trockengewichte/Zelle der haploiden Stämme der Reihe II liegen um 30% höher als die der Reihe I. Die CO₂-Entwicklung je Zelle ist daher ungleich, sie ist jedoch der Größe proportional. Bei den di- und polyploiden Stämmen treten zwischen den Reihen Differenzen in der CO₂-Entwicklung/Trockensubstanz auf, obwohl die relative Volumenzunahme in beiden Serien übereinstimmt, abgesehen von der Abweichung des $\alpha\alpha$ -Diplonten der Reihe I. Die genotypischen Unterschiede prägen sich also erst nach einer Erhöhung der Genomzahl auch im Phänotyp aus.

Bei der Reihe I tritt für die Maltosevergärung ein biochemischer „ $\alpha\alpha$ -Effekt“ auf, der in dem heterozygoten Diplonten und dem Triplonten stärker ausgebildet ist als in dem Tetraplonten. Die Differenz in der CO₂-Abgabe/Trockengewicht zwischen der Gruppe der kopulationsfähigen Hefen und dem $\alpha\alpha$ -Diplonten sowie dem Triplonten beträgt 30%, während sie auf den Tetraplonten bezogen nur knapp 20% ausmacht. Bei der Vergärung von Glucose wurde keine Abhängigkeit von der Kombination der Paarungstypallele beobachtet.

LASKOWSKI, LOCHMANN, WACKER u. STEIN (1960) fanden bei Untersuchungen an derselben Reihe, daß für die Folsäure- und Katalaseaktivität zwischen der Gruppe der homozygoten Stämme und der der heterozygoten Stämme eine Differenz von 40—50% auftritt. Die stärkere Aktivität war hier in allen sporulationsfähigen Stämmen im gleichen Maße vorhanden. Andererseits stimmte der Nicotinsäure-, Pantothensäure- und Thiamingehalt im Trockengewicht bei den verschiedenen Stämmen — unabhängig von der Kombination der Paarungstypallele — überein. Ein Einfluß der Heterozygotie der Allele a und α auf die Ausprägung der Merkmale ließ sich auch hier nicht für alle Eigenschaften nachweisen. Daß in den Fällen, in denen eine höhere Aktivität bzw. ein höherer Gehalt einer Substanz im Trockengewicht der sporulationsfähigen Stämme gefunden wurde, die Differenz zu den kopulationsfähigen Stämmen von 20—50% variiert, war, da es sich um verschiedenartige Funktionen der Zelle handelt, zu erwarten. Die biochemische Parallelerscheinung zum „ $\alpha\alpha$ -Effekt“ hängt wahrscheinlich mit der veränderten Struktur der Zelle zusammen, die auch in der Fähigkeit, Sporen zu bilden, zum Ausdruck kommt.

In der Reihe II ist die CO₂-Entwicklung aus Maltose bei den heterozygoten Stämmen gegenüber den homozygoten nicht erhöht. Das Auftreten einer biochemischen Parallelerscheinung zum „ $\alpha\alpha$ -Effekt“ bei der Maltosevergärung hängt demnach von dem Genotyp der Stämme ab. Vielleicht wird infolge einer bestimmten Kombination der Maltose-Gene bereits im homozygoten Diplonten eine maximale Gärgeschwindigkeit erreicht, so daß keine weitere Steigerung mehr möglich ist. Bei den Diplonten und dem Triplont der Reihe II tritt — unabhängig von der Kom-

bination der Paarungstypallele bei der Vergärung beider Zucker — eine Erhöhung der Gärgeschwindigkeit über den der Kernwertigkeit proportionalen Wert hinaus auf. Da die Vergärung von Glucose und Maltose, bezogen auf das Trockengewicht, im gleichen Maße, nämlich um 25%, gegenüber den Haplonten gesteigert ist, könnte vermutet werden, daß durch die Erhöhung der Genomzahl eine Veränderung der Zelle verursacht wird, die eine Beschleunigung der verschiedenen Stoffwechselvorgänge zur Folge hat. Daß hier für die Maltose-Gene ein Gendosisseffekt vorliegt, wie er von NELSON (1954) für das Galaktose-Gen G_1 beschrieben wurde, ist unwahrscheinlich, da nicht nur die Maltosevergärung stärker ist als zu erwarten war, sondern auch die der Glucose.

Nach THORNE (1961) ist die Gärgeschwindigkeit einer Hefe ausschließlich durch zwei Faktoren bestimmt, durch ihren Stickstoffgehalt und durch ihre spezifischen Eigenschaften. Da wir nachweisen konnten, daß der Stickstoffgehalt im Trockengewicht bei den Stämmen einer homologen Reihe übereinstimmt, sind die quantitativen Unterschiede in der CO_2 -Abgabe hier nicht durch einen verschiedenen N-Gehalt bedingt. Auch OGUR (1955) fand bei Stämmen mit verschiedenen Genomzahlen einen gleichen Stickstoffgehalt im Trockengewicht.

Vergleicht man die hier bestimmte relative Zunahme der CO_2 -Abgabe bei der Vergärung von Maltose und Glucose mit den Angaben anderer Autoren, z. B. OGUR (1954) und SARACHEK (1958), über den Gehalt verschiedener Substanzen je Zelle, so muß berücksichtigt werden, daß hierbei Mittelwerte mehrerer haploider bis tetraploider Stämme, die sich nicht von demselben Ausgangsstamm herleiten, vorliegen. Abweichungen von 25–30% von einem der Genomzahl proportionalen Anstieg können nicht als solche erkannt werden. So fand OGUR (1954), daß die Atmung und die aerobe Gärung bei Vorliegen von Glucose bei haploiden bis tetraploiden Stämmen proportional dem Kernwertigkeitsgrad anstieg. Untersuchungen von SARACHEK (1958) haben gezeigt, daß der Asparagin- und Glutaminsäuregehalt/Zelle bei haploiden bis tetraploiden Stämmen ebenfalls proportional der Genomzahl zunimmt. Bisher hat sich also für alle geprüften Eigenschaften eine quantitative Veränderung infolge der Genomzahlerhöhung ergeben, die in fast allen Fällen mindestens der Vielfachung der Chromosomensätze entspricht, wenn nicht eine Steigerung über den der Kernwertigkeit gemäßen Wert hinaus auftritt.

Ein Vergleich der Befunde bei Hefen mit denen bei höheren Pflanzen stößt insofern auf Schwierigkeiten, als hier der Gehalt je Zelle nicht als gemeinsames Bezugssystem verwendet werden kann. Bei höheren Pflanzen tritt meist nach einer Erhöhung der Kernwertigkeit keine gleichmäßige Vergrößerung der Zellen in allen Pflanzenteilen ein, außerdem kommt oft eine Veränderung der einzelnen Organe zustande, die einen Einfluß auf einige Eigenschaften haben kann. In einzelligen Organismen

dagegen kann sich die Gesamtauswirkung der Genomzahländerung ausprägen, ohne daß sie durch die wechselseitige Beeinflussung der Zellen eines Gewebes überlagert wird. Es waren hier besonders Untersuchungen über Stoffwechselvorgänge von Interesse. Von SCHWANITZ (1950) liegen Angaben über die Atmung bei diploiden und autotetraploiden Formen von *Cucurbita maxima*, *Cucurbita pepo* L., *Sinapis alba* L., *Digitalis purpurea* und *Raphanus sativus* vor. Es wurde gefunden, daß bei den Tetraplonten die Atmung, berechnet auf das Trockengewicht, nur 61 bis 87% von der der diploiden Pflanze betrug. Bezogen auf die gleiche Blattoberfläche ist kein Unterschied zwischen Tetraplonten und Diplonten nachweisbar. Die Oberfläche ist hier also der begrenzende Faktor bei der Atmung. Für die CO_2 -Abgabe bei Hefen ist beim Substrat Glucose kein Unterschied zwischen Diplont und Tetraplont vorhanden, und bei der Maltosevergärung beträgt die Differenz 10%. Betrachtet man bei den Ergebnissen an Hefen die Zelloberfläche als analog der Blattoberfläche, so entwickeln $\alpha\alpha$ -Diplont und Tetraplont, bezogen auf die Oberfläche, gleiche Mengen CO_2 aus Maltose, während die CO_2 -Abgabe beim Triplonten 15% über diesen Werten liegt. Der $\alpha\alpha$ -Diplont hat eine um 20% niedrigere CO_2 -Entwicklung aus Glucose als der Tetraplont und Triplont. Erst beim Übergang vom triploiden zum tetraploiden Zustand scheint auch bei den Hefen die geringere relative Oberfläche sich hemmend auf die Stoffwechselvorgänge auszuwirken.

Die Abnahme der Gärgeschwindigkeit kann demnach nicht nur auf die erhöhte Zellgröße und die damit verbundenen ungünstigeren Oberflächenverhältnisse zurückgeführt werden. Dies zeigen auch die Ergebnisse der von BEYSEL (1957a) an Zuckerrüben vorgenommenen Versuche. Je nach den Umweltsbedingungen können hier entweder die Triplonten oder aber die Tetraplonten die höchsten Assimilations- bzw. Atmungswerte aufweisen. Weiterhin zeigen Pflanzen mit verschiedenen Genomzahlen eine unterschiedliche Abhängigkeit der Viscosität von den Umweltseinflüssen (BEYSEL 1957b). Bei feuchter Witterung haben die Triplonten die höchste Viscosität, während in Trockenperioden die Tetraplonten die höchste Viscosität aufweisen. Die verschiedenen Eigenschaften haploider, diploider, triploider und tetraploider Organismen müssen auch noch auf anderen Ursachen als auf den veränderten Oberflächenverhältnissen beruhen.

Abschließend sollen die Ergebnisse dieser Arbeit noch im Zusammenhang mit den Befunden von EMEIS u. WINDISCH (1960) betrachtet werden. Die Autoren untersuchten 12 Betriebshefen hinsichtlich ihrer Kernwertigkeit; 9 der geprüften Stämme erwiesen sich als triploid und 1 als tetraploid. Die Aufspaltungsverhältnisse der übrigen Stämme konnten nicht mit einem der theoretischen Verhältnisse in Übereinstimmung gebracht werden. Das häufige Auftreten triploider Formen bei Kultur-

hefen läßt vermuten, daß die Triplonten unter den technischen Bedingungen der Gärungsgewerbe einen Selektionsvorteil haben. Bei der hier geprüften Maltosevergärung sind die Triplonten dem Tetraplonten in der CO_2 -Entwicklung, bezogen auf die Trockensubstanz, überlegen, den Diplonten jedoch nicht. Da die Wachstumsrate der Di- und Triplonten übereinstimmt, geht die Bildung der Trockenmasse bei den Triplonten schneller vor sich, so daß hierin ein Vorteil gegenüber den Diplonten liegen mag. Dies gilt für die Stämme homologer Reihen; in den weitgehend heterozygoten Kulturhefen können jedoch noch zusätzlich Heterosiseffekte auftreten, die in den triploiden Stämmen besonders stark ausgeprägt sein können. Die gegenüber den Tetraplonten gesteigerte Leistungsfähigkeit mancher triploider Formen bei Kulturpflanzen, z. B. bei Zuckerrüben (SEDLMAYR 1957), wird auch auf in dieser Genomstufe besonders stark zum Ausdruck kommende Heterosiseffekte zurückgeführt.

Zusammenfassung

I. Kreuzungen und Isolationsversuche

1. Aus einem haploiden Stamm (*Saccharomyces diastaticus*) wurden für den Paarungstyp homozygote und heterozygote Diplonten isoliert und durch entsprechende Kreuzungen ein Triplont gewonnen. Versuche an sieben weiteren Haplonten verschiedener Herkunft haben gezeigt, daß das Auftreten von Diplonten in haploiden Kulturen stammspezifisch ist. In einigen Stämmen konnten keine Diplonten gefunden werden. In einer haploiden Kultur traten spontan Tetraplonten auf.

2. Die haploiden Stämme α -41 und MRA_2 enthalten je ein Maltose-Gen, das als identisch mit dem Gen M_1 bestimmt wurde.

3. In zwei Maltose-negativen Stämmen ließen sich durch fortlaufende Züchtung in einem Selektionsmedium keine Vergärertypen anreichern und isolieren. Auch nach UV-Behandlung konnten keine maltosevergärenden Mutanten gefunden werden.

II. Vergleichende Untersuchungen an Stämmen homologer polyploider Reihen

1. An haploiden, di-, tri- und tetraploiden Hefestämmen wurde mit dem Warburgapparat die CO_2 -Abgabe bei der Vergärung von Maltose und Glucose gemessen. Die Zellgröße und das Trockengewicht je Zelle der geprüften Stämme wurde bestimmt. Als Untersuchungsmaterial standen 12 Stämme von zwei isogenen Reihen der Gattung *Saccharomyces* zur Verfügung. Die Reihe I umfaßt 7 Stämme mit haploiden bis tetraploiden Chromosomensätzen und unterschiedlicher Kombination der Paarungstypallele. Der haploide Ausgangsstamm enthält das Gen M_1 . Die Reihe II bestand aus 5 haploiden bis triploiden Stämmen. Der haploide Ausgangsstamm enthielt 3 verschiedene Maltose-Gene.

2. Die Volumina und die Trockengewichte je Zelle der haploiden Stämme der Reihe II liegen um etwa 30% höher als die der Reihe I. Die CO_2 -Abgabe je Trockengewicht bei der Vergärung von Glucose sowie von Maltose stimmt bei den vier haploiden Stämmen überein. Innerhalb einer Reihe steigen das Volumen und das Trockengewicht je Zelle proportional der Genomzahl an.

3. In der Reihe I nimmt die CO_2 -Entwicklung je Trockengewicht aus Glucose von den Haplonten bis zum Tetraplonten zu, wenn auch nicht alle Unterschiede zwischen den einzelnen Genomstufen statistisch zu sichern sind. Je Zelle ist ein der Genomzahl etwa proportionaler Anstieg der CO_2 -Abgabe zu beobachten. Bei der Vergärung von Maltose ist die CO_2 -Entwicklung von der Kombination der Paarungstypallele abhängig. Bezogen auf das Trockengewicht liegt die CO_2 -Abgabe der für den Paarungstyp heterozygoten Stämme um 20–30% höher als die der homozygoten Diplonten sowie die der Haplonten.

4. Bei den Stämmen der Reihe II hängt die Gärgeschwindigkeit nicht von der Kombination der Paarungstypallele ab. Die CO_2 -Entwicklung aus Glucose und Maltose ist bei den Diplonten und dem Triplonten um 25% höher als bei den Haplonten.

Die Arbeit wurde im Institut für Gärungsgewerbe in der Mikrobiologischen Abteilung unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. S. WINDISCH angefertigt.

Die Stämme der polyploiden Reihe I wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. W. LASKOWSKI zur Verfügung gestellt.

Literatur

- BEYSEL, D.: Osmotischer Wert und Viskosität des Protoplasmas diploider und polyploider Zuckerrüben. Ber. dtsh. bot. Ges. **70**, 109 (1957a).
 — Assimilations- und Atmungsmessungen an diploiden und polyploiden Zuckerrüben. Züchter **27**, 261 (1957b).
 COOK, A.: The chemistry and biology of yeasts. New York 1958.
 EMEIS, C. C.: Polyploide Kulturhefen, p. 40. Proceedings European Brewery Convention. Congress Vienna 1961.
 — Aneuploide Hefen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **184**, 247 (1962).
 —, u. H. GUTZ: Eine einfache Technik zur Massenisolation von Hefesporen. Z. Naturforsch. **13b**, 647 (1958).
 —, u. S. WINDISCH: Bestimmung der Kernwertigkeit (Ploidiegrad) von Hefen der Gattung *Saccharomyces* mit Hilfe der Massenisolationstechnik. Z. Naturforsch. **15b**, 702 (1960).
 FOWELL, R. R.: Sodium acetat agar as a sporulation medium for yeast. Nature (Lond.) **170**, 578 (1952).
 GILLILAND, R. B.: Identification of the genes for maltose fermentation in *Saccharomyces diastaticus*. Nature (Lond.) **173**, 409 (1954).
 GUTZ, H., u. C. C. EMEIS: *Saccharomyces* als Objekt für populations-genetische Versuche. Z. Naturforsch. **14b**, 457 (1959).
 LASKOWSKI, W.: Inaktivierungsversuche mit homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades. I. Aufbau homozygoter Stämme und Dosiseffektkurven für ionisierende Strahlen, UV und organische Peroxyde. Z. Naturforsch. **15b**, 495 (1960).

- LASKOWSKI, W., E. LOCHMANN, A. WACKER u. W. STEIN: Inaktivierungsversuche III. Biochemische Eigenschaften in Abhängigkeit von Ploidiegrad und Kombination der Paarungstypallele. Z. Naturforsch. **15b**, 731 (1960).
- , u. W. STEIN: Inaktivierungsversuche II. Mikroskopische Beobachtungen nach Inaktivierung mit ionisierenden Strahlen, UV und organischen Peroxyden. Z. Naturforsch. **15b**, 604 (1960).
- LEDERBERG, J., and E. M. LEDERBERG: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bact. **63**, 399 (1952).
- LINDEGREN, C. C.: Methods for the Diagnosis of Gene-controlled Fermentative ability in *Saccharomyces*. Wallerstein Lab. Comm. **19**, 49 (1956).
- , and G. LINDEGREN: A new method for hybridizing yeast. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **29**, 306 (1943).
- — Tetraploid *Saccharomyces*. J. gen. Microbiol. **5**, 885 (1951).
- MIYAKE, T.: Mutator factor in *Salmonella typhimurium*. Genetics **45**, 11 (1960).
- MORTIMER, R. K.: Radiobiological and genetic studies on a polyploid series (haploid to hexaploid) of *Saccharomyces cerevisiae*. Radiat. Res. **9**, 312 (1958).
- NELSON, N.: Vortrag auf dem Meeting of the AAAS in Pullman, Washington, Juni 1954.
- OGUR, M.: Respiration in a polyploid series in *Saccharomyces*. Arch. Biochem. **53**, 484 (1954).
- The rapid estimation of ploidy in cultures of *Saccharomyces*. J. Bact. **69**, 159 (1955).
- , and J. JOHN: A differential and diagnostic plating method for population studies of respiration deficiency in yeast. J. Bact. **72**, 500 (1956).
- POMPER, S.: Isolation of triploid *Saccharomyces cerevisiae*. Nature (Lond.) **170**, 892 (1952).
- ROMAN, S.: A system selective for mutations affecting the synthesis of adenine in yeast. C. R. Lab. Carlsberg, Sér. physiol. **26**, 299 (1956).
- D. C. HAWTHORNE and H. C. DOUGLAS: Polyploidy in yeast and its bearing on the occurrence of irregular genetic ratios. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **37**, 79 (1951).
- M. M. PHILLIPS and S. M. SANDS: Studies of polyploid *Saccharomyces*. I.: Tetraploid segregation. Genetics **40**, 546 (1955).
- SARACHEK, A.: The free amino acid contents and growth rates of polyploid *Saccharomyces*. Experientia (Basel) **14**, 360 (1958).
- SCHWANITZ, F.: Untersuchungen an polyploiden Pflanzen. VII: Zur Atmung diploider und autotetraploider Pflanzen. Züchter **20**, 76 (1950).
- SEDLMAYR, K.: Rekurrente Selektion auf reziproke Kombinationsfähigkeit. Ein Beitrag zur Züchtung polyploider Heterosispopulationen bei *Beta vulgaris*. Züchter **27**, 65 (1957).
- SPIEGELMAN, S., R. R. SUSSMAN and E. PINSKA: On the cytoplasmic nature of long-term adaptation in yeast. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **36**, 591 (1950).
- STEIN, W., u. W. LASKOWSKI: Inaktivierungsversuche IV. Quantitative Deutung unter Berücksichtigung genetischer und nicht genetischer Anteile. Z. Naturforsch. **15b**, 734 (1960).
- THORNE, R. S. W.: Fermentation velocity of brewery yeasts. Brewers Digest **36**, No. 7, 38 (1961).
- WEBER, E.: Grundriß der biologischen Statistik, 3. Aufl. Jena 1957.
- WINDISH, S., u. C. C. EMEIS: Genetische Untersuchungen über die Vergärung von Maltotriose. Brauerei wiss. Beil. **13**, 2 (1960).
- WINGE, Ö.: On haplophase and diplophase in some *Saccharomycetes*. C. R. Lab. Carlsberg **21**, 77 (1935).

WINGE, Ö., and O. LAUSTSEN: On two types of spore germination and on genetic segregations in *Saccharomyces* demonstrated through single-spore cultures. C. R. Lab. Carlsberg **22**, 99 (1937).

- , and C. ROBERTS: Inheritance of enzymatic characters in yeasts and the phenomenon of longterm adaptation. C. R. Lab. Carlsberg, Sér. physiol. **24**, 263 (1948).
- — The identification of the gene for Maltose fermentation in *Saccharomyces italicus*. Nature (Lond.) **166**, 1114 (1950).
- — The polymeric genes for maltose fermentation in yeast and their mutability. C. R. Lab. Carlsberg, Sér. physiol. **25**, 35 (1950a).
- — Complementary action of melibiase and galactozymase on raffinose fermentation. Nature (Lond.) **177**, 383 (1956).

Dr. RAGNHILD SCHEDA,
Institut für Gärungsgewerbe und Stärkefabrikation,
1 Berlin 65, Seestraße 13

Lebenslauf

Am 5. 5. 1934 wurde ich, Ragnhild Scheda, in Berlin-Wilmersdorf als Tochter des Chemikers Dr. phil. Berthold Scheda geboren.

1940 wurde ich in der Westschule in Berlin-Schlachtensee eingeschult. Von 1945 bis 1953 besuchte ich den neusprachlichen Zweig der Malvida v. Meysenbug-Schule. 1953 legte ich hier die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1953 begann ich mein Studium mit dem Hauptfach Botanik an der Freien Universität in Berlin. Hier habe ich 1956 die Vorprüfung zur Diplomprüfung in Biologie abgelegt. Nach einem zehnsemestrigen Studium an der Freien Universität und an den Universitäten in Tübingen und Freiburg habe ich am 16.2. 1959 vor dem Wissenschaftlichen Landesprüfungsamt in Berlin die Erste Staatsprüfung in den Fächern Biologie und Chemie bestanden.

Seit dem 1. 8. 1959 bin ich am Institut für Gärungsgewerbe in der Mikrobiologischen Abteilung, Leiter: Prof. Dr. S. Windisch, mit meiner Promotionsarbeit beschäftigt gewesen.

